



HAL
open science

Impact de *Pseudomonas aeruginosa* sur *Staphylococcus aureus* dans un contexte de coexistence bactérienne chez les patients atteints de mucoviscidose

Paul Briaud

► To cite this version:

Paul Briaud. Impact de *Pseudomonas aeruginosa* sur *Staphylococcus aureus* dans un contexte de coexistence bactérienne chez les patients atteints de mucoviscidose. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1345 . tel-02968587

HAL Id: tel-02968587

<https://theses.hal.science/tel-02968587>

Submitted on 16 Oct 2020

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.

N°d'ordre NNT : 341



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystemes, Microbiologie, Modelisation (E2M2)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Soutenue publiquement le 11/12/2019, par :
Paul Briaud

**Impact de *Pseudomonas aeruginosa* sur
Staphylococcus aureus dans un contexte de
coexistence bactérienne chez les patients
atteints de mucoviscidose**

Devant le jury composé de :

FRANCOIS Patrice, PU-PH, Université de Genève

Rapporteur

HERY-ARNAUD Geneviève, PU-PH, Université de Bretagne

Rapporteuse

MARCHANDIN Hélène, PU-PH, Université de Montpellier

Rapporteuse

VERHOEVEN Paul, MCU-PH, Université de Saint-Etienne

Examineur

VANDENESCH François, PU-PH, Université Lyon 1

Président du Jury

MOREAU Karen, PU, Université Lyon 1

Directrice de thèse

“When the impossible has been eliminated, all that remains no matter how improbable is possible”

« Lorsque vous avez éliminé l'impossible, ce qui reste, si improbable soit-il, est nécessairement la vérité »

Sir Arthur Conan Doyle

À Alexandra Elbakyan, qui lutte pour une science accessible à tous

Remerciements

Tout d'abord, merci aux rapporteurs Marchandin Hélène, Hery-Arnaud Geneviève et Patrice François d'avoir accepté de lire et de juger cette thèse.

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse. Karen, je ne saurais jamais assez te remercier de m'avoir encadré pendant ces 3 années. Avec Laura, nous te considérons comme notre maman scientifique. Tu m'as formé, transmis ton savoir et ta passion pour la science. Pendant ces 3 années, tu as toujours su rester disponible malgré ton emploi du temps très souvent chargé. Merci de m'avoir permis de partir à Londres pendant 2 mois, merci de diriger la thématique « muco » de la meilleure des façons, merci pour ton encadrement, merci pour tout, merci. Je te souhaite le meilleur scientifiquement et personnellement.

Je tiens ensuite à remercier François Vandenesch pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci d'avoir toujours été à l'écoute de mes travaux et merci de votre bonne humeur tout au long de ces 3 années.

Alors Laura, je me rappelle bien d'une stagiaire de M2 qui s'excusait par peur d'être trop taquin avec moi. Cette stagiaire est belle est bien morte et enterrée ! Merci d'avoir postulé pour ce stage et merci d'avoir obtenu cette bourse de thèse il y a maintenant 2 ans de cela ! On a passé des sacrés moments au labo comme en dehors (principalement dans les bars, je te l'accorde). Merci pour tes discussions, ta bonne humeur, d'étudier le côté Pseudo que j'ai un peu laissé de côté en début de thèse... Je te souhaite le meilleur pour la thèse et l'après thèse (rempli de cookies du crous, bien évidemment).

Pour Sylvère, bon courage :

HNAKG TIJTH JCQDC CTADJ QAXYP BPXHI JTHSD JSPCH RTEJT IJUPX HPKTR
JCRIE TGUTR IXDCC XHITB TGRXE DJGID JIRTF JTIJP HUPXI RDCRT GCPCI
ATEGD YTIBJ RDTIB TGRXS PKDXG SRDJK TGIAP CDJKT AATED BETCD GZIJU
PXHJC IGPKP XAIXI PCTHF JTFJX THIEP GUDXH BPAGT RDCCJ HXCDC BTGRX
EDJGI DJITH RTHHD XGTHT IRTHS XHRJH HXDCH IGHHD JKTCI EWXAD
HDEWX FJTBT GRXED JGRTH QPGQT RJTEX HRXCT HTIRT HIGPF JTCPG
SHSPC HATHF JTAHY TBTAP XHHTI GDEUP RXATB TCITB QPGFJ TGYTI
THDJW PXITK GPXBT CIATB TXAAT JGEDJ GIDXS PCHID JHATH EDXCI HSTIP
KXTBT GRX

A ma voisine de bureau durant ces 3 années. Merci MILLE FOIS Jess pour tous tes conseils et pour ce que tu m'as appris en bactériologie, en biologie moléculaire et en culture cellulaire. Tu es une scientifique de haut niveau avec de nombreux talents. Merci pour ton sérieux coup de main pour le projet Nor. Merci pour tous ces merveilleux moments à rigoler, à discuter, à manger, à boire le fameux café du 9h. Le meilleur pour ta nouvelle vie avec les endives.

Merci Flo pour ta joie de vivre, pour ton rire très communicatif. Pour tout ces moments passés à discuter (de science ou pas). Merci d'avoir toujours su rire à mes blagues dont la majorité ne sont pas amusantes. Garde la pêche et l'abricot !

Ced, tu comprendras le petit clin d'œil à la couleur. Je tiens à te remercier pour ta gentillesse et ta disponibilité, pour tes conseils scientifiques et ta bonne humeur. Ne t'inquiète pas, tu vas le trouver ce récepteur de la TSST ! Que ta vie soit remplie de vert.

Ahhhh, Katia. Si je pouvais emener ton rire avec moi, je le ferais sans hésiter ! Tu es dotée d'une bonté et d'une générosité incroyable. Tu as toujours été d'une joyeuseté imperturbable pendant ces 3 ans. Merci pour tout le travail herculéen que tu abats tous les jours. Je m'excuse sincèrement pour le millier d'erien que j'ai pu utiliser pendant ma thèse...

A la dernière recrue en date. Mariane merci pour ces discussions que l'on a eues et ta joie de vivre au quotidien. La thèse est un parcours semé d'embûche mais tu ne vas avoir aucun mal à franchir la ligne d'arrivée.

Merci beaucoup à tous les nouveaux voisins du 5^{ème} étage : Jérôme, Jason, Andréa, Lélia, Clara, Marie, Marine pour votre gentillesse et les super bons moments passés tous ensembles (dont une bonne partie au bar, il est vrai). C'est dommage que votre déménagement ne se soit pas produit plus tôt. J'aurais aimé en profiter une année de plus. Petite note pour le grand barbu : ne t'en fais, *S. aureus* s'internalise aussi bien dans les ostéoblastes que tu internalises la bière ! En tout cas encore félicitation pour ton poste de MCU et pour l'arrivée de JJ Junior !

Je tenais particulièrement à remercier Angelika Grundling pour son accueil au MRC à Londres pendant 2 mois. Sans elle, une des parties de ma thèse n'aurait jamais vu le jour. Je te remercie énormément Christopher, de ta patience (avec mon anglais qui t'a fait rire) et de ton encadrement parfait pendant ces 2 mois. Just keep the way you are Chris, and don't forget to get SCHWIFTY!!!!

A tous ceux des hopitaux avec qui j'ai pu travailler. Anne pour ton énorme implication dans le projet muco et la collecte des souches cliniques. Christophe, pour toutes tes remarques très pertinentes qui m'ont aidé à débloquer des situations délicates.

Aucun remerciement ne sera assez fort pour mes parents et mon frère et ma sœur, qui ont toujours été là pour moi, dans les moments de doutes, de fatigues, de bonheurs et de joies. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est bien évidemment à vous tous !

A tous mes amis qui m'ont supporté et me supportent toujours ! Les lyonnais Maxime, Nina, Guillaume et Camille. Mes amis plus lointains géographiquement, Thibault (félicitation pour la floride et pour ton Junior), Martin, Damien, Alan, Vincent (merci encore pour les knackis), Axel (Doggybag pour les intimes) et Mathieu. Mes amis d'enfance, Yves-Elie, Thomas et Arthur. Merci pour ces précieux moments me permettant d'arriver à ces dernières lignes.

Et à tous celles et ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Ne voyez là qu'un malheureux oublié...

Résumé

Les poumons des patients atteints de mucoviscidose (CF) sont séquentiellement colonisés par *Staphylococcus aureus* puis par *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Lors de cette colonisation, ces deux bactéries interagissent l'une avec l'autre selon deux modes possibles. Une interaction compétitrice, bien caractérisée, est généralement observée dans les co-colonisations précoces où des produits issus du quorum-sensing de PA ralentissent la croissance de SA et entraînent sa lyse. Une interaction de coexistence, peu caractérisée se produit avec les souches dites tardives de PA qui ne sont plus virulentes envers SA. L'objectif de mes travaux de recherche a été de caractériser l'impact de PA sur la physiologie de SA. Des analyses transcriptomiques et confirmations phénotypiques sur des isolats cliniques en coexistence révèlent une amélioration de la résistance aux antibiotiques et de l'internalisation de SA dans les cellules de l'hôte, en présence de PA. Une approche par Tn-seq a identifié des gènes codant de grands régulateurs majeurs de SA (*agr*, *sigB*, *arlR*) comme étant essentiels dans cette interaction de coexistence. Une étude clinique rétrospective menée sur la cohorte lyonnaise des patients CF a montré que 65% des patients co-colonisés présentaient une paire SA-PA en état de coexistence. Cette étude note une détérioration pulmonaire dépendante du statut infectieux (SA<PA=SA+PA). Mon projet a donc montré que la présence des régulateurs globaux de SA sont importants pour coexister avec PA et de modifier son transcriptome augmentant sa résistance aux antibiotiques et son internalisation. Le caractère poly bactérien des infections devrait être pris en compte lors des traitements.

Mots clés : Mucoviscidose, interaction, coexistence, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, RNA-seq, TN-seq

Impact of *Pseudomonas aeruginosa* on *Staphylococcus aureus* in a context of coexistence in cystic fibrosis patient lungs

Cystic fibrosis (CF) patient lungs are colonized by *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in this subsequent order. These bacteria interact each other during this colonization and two different interaction states are often depicted. The well-known competition state occurs when the so-called early infecting strains of PA produce quorum-sensing dependent virulence factors slowing SA growth and leading to its lysis. On the contrary the late-infecting strains of PA are not able to produce these virulence factors and a coexistence state seems to emerge with SA. The aim of my thesis project was to decipher the impact of PA coexisting strains on SA lifestyle. Transcriptomic analyses followed by phenotypic experiments confirmed an increase of SA antibiotic resistance its internalization within host cells, in the presence of PA. A Tn-seq method identified SA genes involved in major regulators (e.g *agr* system, *sigB* operon, *alrR*) as essential for the coexistence state with PA. Moreover, a retrospective clinical study on Lyon CF patient's cohort showed that 65% of co-infected patients carried a coexisting SA/PA couple of strains. This study also indicated that the infectious status of CF patient was correlated with the severity of the disease (SA<PA=SA+PA). My project concludes about the importance of SA major regulators in this coexistence state and the transcriptomic changes triggering phenotypic modifications such as antibiotic resistance and internalization within host cells. These bacterial interactions should be considered to treat poly-microbial infections.

Key words: Cystic fibrosis, interaction, coexistence, Staphylococcus, Pseudomonas, RNA-seq, TN-seq

Laboratoire de Rattachement

Cette thèse a été préparée au sein du laboratoire INSERM U1111 – Centre International de Recherche en Infectiologie, équipe Pathogénie des Staphylococques

Adresse postale du laboratoire :

CIRI-INSERMU1111

Faculté de Médecine Lyon-Est, 7 rue Guillaume Paradin 69008 LYON CEDEX 8 -
France

Abbreviations

ABC	ATP Binding Cassette	CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
ACME	Arginine Catabolism Mobile Element	CRE	cAMP Response Element
ADP	Adénosine Diphosphate	ENaC	Amiloride sensitive epithelial channel
ADN	Acide deoxyribonucléique	ermR	Erythromycin Resistant
AHL	N-Acyl-Homoserine Lactone	FAMD	Factor Analysis of Mixed Data
AI-2	Auo-Inducer	FEV1	Force Expiratoire Maximale par seconde
AMP	Adenosine Monophosphate	GDP	Guanosine Diphosphate
AP-1	Activator Protein 1	GlcNAc	N-acetyl Glucosamine
ARNm	Acide Ribonulcéotide Messenger	GMP	Guanosine Monoposphate
ASL	Airway Surface Liquid	GRE	Glucocorticoid Response Element
ATP	Adénosine Triphosphate	GTP	Guanosine Triphosphate
BHI	Brain Heart Infusion	HHQ	2-Heptyl-4-Hydroxy-quinoline
C/EBP	CCAAT-Enhancer-Binding-Protein	HQNO	4-hydroxy-2-heptyl-quinoline-N-oxide
CBAVD	Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens	HRE	Hypoxia Response Element
CF	Cystic Fibrosis	IAI	Institut des Agents Infectieux
CFBD	Cystic Fibrosis Bone Disease	IMC	Indice de Masse Corporelle
CFLD	Cystic Fibrosis Liver Disease	IMP	Inosine Monophosphate
CFRD	Cystic Fibrosis Related diabetes	LPS	Lipopolysaccharide
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator	MHB	Mueller Hinton Broth

MPC	Magnetic Particle Collector	TMD	Transmembran Domain
MRSA	Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	TMP/SFX	Trimethoprime-Sulphamethoxazol
MSA	Mannitol Salt Agar	TSB	Tryptic Soy Broth
MSSA	Methicilin Sensible <i>Staphylococcus aureus</i>	TSS	Transcription Start Site
NBD	Nucleotide Binding Domain	UFC	Unité Formant des Colonies
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B	UFP	Unité Formant des Plages de lyse
NGS	Next Generation Sequencing		
OPG	Ostéoprotegerine		
ORCC	Outwarding Rectifying Chloride Channel		
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern		
PCL	Periciliary Layer		
PKA	Protein Kinase A		
PKGII	Protein Kinase G type II		
PRP	Potential Respiratory Pathogen		
PRPP	Phosphoribosyl Pyrophosphate		
PSM	Peptide Soluble Moduline		
RNR	Ribonucléotide Réductase		
SCV	Small Colony Variant		
SP1	Specificity Protein 1		
TCS	Two Component System		
TD-SCV	Thymidine Small Colony Variant		

Table des matières

I.	Introduction.....	15
II.	Bibliographie.....	20
II.1.	La mucoviscidose.....	21
II.1.1.	Généralités.....	21
II.1.1.1.	Histoire.....	21
II.1.1.2.	Manifestations cliniques.....	22
II.1.1.3.	Les mutations impliquées dans la mucoviscidose.....	25
II.1.1.4.	Epidémiologie.....	28
II.1.1.5.	Avantage d'être hétérozygote ?	32
II.1.2.	Gène et protéine CFTR	35
II.1.2.1.	Organisation génétique et expression du gène <i>cfr</i>	35
II.1.2.2.	Protéine CFTR et fonctionnement moléculaire.....	36
II.1.2.3.	Fonctions régulatrices du canal CFTR	39
II.1.2.4.	Rôles physiologiques de CFTR.....	40
II.1.2.5.	Poumon et CFTR : mucus et protection	41
II.1.2.6.	Conséquences physiopathologiques de l'absence de CFTR.....	45
II.2.	Les infections polymicrobiennes chez les patients CF	48
II.2.1.	Le microbiome respiratoire des patients CF	48
II.2.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> dans la mucoviscidose.....	51
II.2.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose	54
II.2.4.	L'impact de la co-infection <i>Staphylococcus aureus/Pseudomonas aeruginosa</i> sur l'état de santé des patients CF	57
II.3.	Les interactions entre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les poumons des patients CF	60
II.3.1.	L'état de compétition	61

II.3.1.1.	Action directe	61
II.3.1.2.	Action anti-biofilm	63
II.3.1.3.	Compétition nutritionnelle	64
II.3.1.4.	Manipulation du système immunitaire.....	65
II.3.2.	L'état de coexistence	65
II.3.2.1.	Passage de la compétition à la coexistence.....	65
II.3.2.2.	Evolution de <i>Staphylococcus aureus</i>	66
II.3.2.3.	Evolution de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
II.3.2.4.	Rôle de l'hôte	68
II.3.2.5.	La coexistence entre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
II.4.	Objectifs de la thèse	72
III.	Résultats expérimentaux	74
	La coexistence avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> modifie le transcriptome de <i>Staphylococcus aureus</i> , son antibiorésistance et son internalisation dans les cellules épithéliales	75
	Introduction.....	76
	La plupart des souches de co-infections de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> coexistent, une condition n'impactant pas la santé des patients atteints de la mucoviscidose.	92
	Introduction.....	93
	Les gènes essentiels de <i>Staphylococcus aureus</i> nécessaires à la coexistence avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	127
	Introduction.....	128
	NorK est une nouvelle pompe à efflux impliquée dans la résistance à la norfloxacine chez <i>Staphylococcus aureus</i>	161
	Introduction.....	162
IV.	Discussion et perspectives	176

IV.1. L'implication du système <i>agr</i> dans la coexistence avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	179
IV.2. Purine, Tet38 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	184
IV.3. Les polyamines, potentiel signal des dérégulations transcriptomiques.....	187
IV.4. L'impact de la co-infection et de la coexistence chez les patients atteints de mucoviscidose	191
IV.5. Conclusion	194
V. Communications orales	195
VI. Références	197

I. Introduction

Introduction

Rares sont les espèces vivantes évoluant de manière isolée. Le mode de vie le plus partagé sur notre planète est la communauté. Des Hommes aux bactéries, en passant par le règne végétal, la vie en groupe apporte des avantages essentiels quant à la colonisation d'un environnement. Les bactéries représentent 15% de la biomasse totale de la Terre et chez un Homme, on peut compter autant de bactéries que de cellules composant son propre corps (Bar-On et al., 2018; Sender et al., 2016). Ces procaryotes ont aussi une vie en communauté et les interactions qui composent cette population modèlent le comportement et l'activité des individus. Depuis l'ère Pasteurienne, les études isolées des bactéries sont le standard des recherches et publications scientifiques et ont permis d'améliorer nos connaissances sur leur biologie et leur biochimie. Ces études ont prouvé leur efficacité et ont permis de caractériser l'impact des bactéries sur la pathogénèse en respectant les 4 postulats de Koch : le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains ; ce micro-organisme doit pouvoir être isolé et croître en milieu de culture pur (ne contenant qu'un seul microbe) ; quand il est introduit dans un organisme sain de la même espèce, le micro-organisme doit provoquer la même maladie ; ce micro-organisme doit être retrouvé dans l'organisme expérimentalement inoculé et reconnu comme étant l'agent causal (Koch, 1882). La tuberculose, la peste, la variole ou encore le sida sont de très bons exemples de la véracité de ces postulats. Cependant, une grande majorité de pathologies ne peut s'expliquer uniquement à partir de ces dictâtes. Les pneumonies, les infections de plaies et brûlures, les abcès ou encore les péritonites sont souvent la conséquence d'infections poly-microbiennes. De plus, il a été admis qu'une infection poly-microbienne est souvent plus délétère pour l'individu qu'une infection semblable causé par un seul agent microbien (Brogden et al., 2005; Kesavalu et al., 1998; Mastropaolo et al., 2005). Murray *et al.*, définit cette synergie poly-microbienne pendant une infection comme étant « l'interaction de deux ou plusieurs micro-organismes au niveau d'un site infectieux qui provoque une sévérité de la maladie plus grande que cette même maladie provoquer par les micro-organismes seuls » (Murray et al., 2014). Par exemple, pendant une inflammation de l'oreille moyenne (otite moyenne), la bactérie *Haemophilus influenzae* promeut la persistance de *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis*, participant au maintien et à la progression de l'inflammation. Aussi, par la production de bêta-lactamases sécrétées par *M. catarrhalis*, la résistance aux antibiotiques de *H. influenzae* augmentent

Introduction

(Armbruster et al., 2010; Weimer et al., 2010). Les interactions bactériennes peuvent aussi intervenir dans l'établissement de l'infection en entraînant une dysbiose du microbiote commensal. Ainsi, lors d'une parodontite, la présence faible (< à 0.01% des bactéries totales) de *Porphyromonas gingivalis* est suffisante pour entraîner une modification qualitative et quantitative du microbiote buccal (Hajishengallis et al., 2011). L'appauvrissement de la diversité et l'augmentation de la concentration bactérienne est un des facteurs de l'apparition de la parodontite (Hajishengallis et al., 2012). Ce type d'interaction fait intervenir la notion de « keystone pathogen » ; théorie dans laquelle la présence qualitative d'une seule bactérie permet de modifier le microbiote commensal environnant qui participe à l'établissement de la maladie (Hajishengallis et al., 2012).

Les personnes atteintes de mucoviscidose souffrent d'infections pulmonaires poly-microbiennes chroniques. Les poumons de ces patients sont un excellent modèle pour l'étude des interactions bactériennes d'intérêt clinique. Le contexte particulier qu'offre ces poumons permet de regarder les impacts des partenaires bactériens sur leur semblable, de prendre en compte la réponse immunitaire de l'hôte et d'observer l'impact de ces interactions sur l'état de santé des patients. Les deux premières parties de l'analyse bibliographique de mon manuscrit apporteront une vision globale de cette maladie génétique et détailleront la physiopathologie de la mucoviscidose en se focalisant sur l'appareil respiratoire.

Dans ce contexte d'infection polymicrobienne, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les agents bactériologiques majoritaires et souvent retrouvées en co-infection chez ses patients (Limoli et al., 2016; Schwerdt et al., 2018). *S. aureus* est une bactérie à coloration de Gram positive pathogène stricte et opportuniste de l'Homme mais aussi un commensal. La zone nasale est admise pour être le lieu de colonisation préférentiel de *S. aureus* (20 à 60% des Hommes colonisés) mais d'autres régions du corps sont aussi concernées : aisselles (8%), abdomen (15%), périnée (22%), intestins (17-31%) et la zone vaginale (5%) (Sollid et al., 2014). En tant que pathogène, elle est responsable d'un spectre large d'infection, allant d'atteinte cutanée bénigne à des infections profondes mortelles (pneumonies nécrosantes, bactériémies, endocardites) (O'Gara, 2017). Cette bactérie possède tout un arsenal de facteur de virulence, l'aidant à la colonisation du site infectieux (FnbpA/B, ClfA...), à la diffusion en profondeur dans l'organisme (e.g Hla/B, HlgA/B/C, PVL) ainsi qu'à

Introduction

l'échappement au système immunitaire (SCIN, Sbl.) et dont la majorité est contrôlée par le système *agr*, le quorum-sensing de *S. aureus* (DeLeo et al., 2009). La recrudescence du nombre d'infection à *S. aureus* mutli-résistant aux antibiotiques classe cette bactérie en priorité 2 (élevée) pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques et agents anti-staphylococciques (Communiqué de presse OMS de Tacconelli, 2017).

P. aeruginosa est un bacille mobile à coloration de Gram négative pathogène opportuniste. Il est l'une des causes majeures de maladies nosocomiales. Il est aussi fréquemment retrouvé dans les infections chroniques de plaies (15-80% des cas suivant les études). La survenue de *P. aeruginosa* dans ce contexte clinique est un facteur aggravant (Korgaonkar et al., 2013). Cette bactérie possède un quorum-sensing complexe reposant sur 4 systèmes interconnectés (LasI/LasR, RhlI/RhlR, PQS et Iqs) (Scoffone et al., 2019) qui contrôlent l'expression de ses facteurs de virulences majeurs.

Les interactions entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* se déroulant dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose révèlent des interactions dynamiques qui évoluent au cours du temps. Un premier état de compétition a bien été étudié pendant les 20 dernières années (Barnabie and Whiteley, 2015; Filkins et al., 2015; Hotterbeekx et al., 2017; Machan et al., 1992; Pernet et al., 2014). Les souches dites d'infections précoces de *P. aeruginosa* sont responsables de la production de nombreux facteurs de virulence, dont une grande majorité sont dépendante de son quorum-sensing et possédant une activité bactériostatique et bactéricide envers *S. aureus*. Néanmoins, un autre état d'interaction a été décrit plus récemment. L'état de coexistence se caractérise par l'absence de lyse de *S. aureus* occasionnée par *P. aeruginosa*. Dans le modèle actuel, les souches appelées tardives de *P. aeruginosa* ne sont plus capables de produire ces facteurs de virulence anti-staphylococcique. Peu de choses sont connues sur l'impact de ce type d'interaction entre les partenaires bactériens ainsi que les mécanismes moléculaires intervenants (Baldan et al., 2014; Limoli et al., 2016; Michelsen et al., 2014; Tognon et al., 2017). Les données connues sur la co-infection et ces deux états d'interaction seront décrits dans les deux dernières parties de l'analyse bibliographique.

Mon projet de thèse s'est donc focalisé sur l'étude de l'impact de *P. aeruginosa* sur la physiologie de *S. aureus* dans ce contexte de coexistence. Ainsi, la partie 1 de l'étude expérimentale porte sur l'impact de *P. aeruginosa* sur le transcriptome de *S.*

Introduction

aureus et ses changements phénotypiques associés. Au regard des données disponibles dans la littérature, une étude clinique rétrospective a été conduite en partenariat avec les Hospices Civils de Lyon (HCL) pour étudier l'impact de la co-infection et de la coexistence sur l'état de santé des patients atteints de la mucoviscidose. Ces données seront présentées dans la partie 2 des résultats expérimentaux. L'étude des déterminants génétiques essentiels à la coexistence de *S. aureus* avec *P. aeruginosa* a ensuite été menée par une approche de transposon sequencing et fera l'objet de la partie 3 des résultats. Finalement, grâce à l'analyse approfondi des données transcriptomiques obtenues dans la partie 1, un nouveau gène de *S. aureus* intitulé *norK* a été découvert. Ce dernier projet annexe, présenté en partie 4, portera sur la caractérisation de ce gène dans la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*.

L'ensemble de ces travaux vise à mieux comprendre l'interaction de coexistence entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. De façon plus général, mon projet apporte de nouvelles informations dans les infections polymicrobiennes et l'impact de telles interactions sur l'état de santé des patients.

II. Bibliographie

II.1. La mucoviscidose

II.1.1. Généralités

II.1.1.1. Histoire

La première description de la mucoviscidose en tant que maladie distincte a été faite en 1938 chez des enfants atteints de malnutrition sévère. Leurs autopsies ont révélé que leurs canaux glandulaires du pancréas étaient obstrués par un mucus épais. Le nom de Fibrose Kystique du pancréas (Cystic Fibrosis of the pancreas, CF) a été attribué à cette maladie (Andersen, 1938). Le terme mucoviscidose fut employé plus tard en référence à la présence du mucus épais bloquant tous les canaux glandulaires sécréteur de mucus du corps (Farber et al., 1943). Les observations effectuées par Paul di Sant'Agnese en 1953 ont permis de mettre en place le test de la sueur pour le diagnostic de la mucoviscidose, qui est toujours le test de référence actuel. Les enfants atteints ont un désordre en électrolytes, une concentration excessive de sels dans les sueurs qui peut être détectée par ionophorèse (Gibson and Cooke, 1959). Mais c'est en 1983 que la première observation cytologique apporte une explication sur le désordre électrolytique observé. Les cellules des canaux sudoripares accumulent les ions chlorure et une entrée massive d'ions sodium et d'eau se produit. La concentration en sels dans la sueur augmente alors (Quinton and Bijman, 1983).

La réelle cause étiologique de la maladie a été découverte en 1989. Le gène responsable de la mucoviscidose, appelé *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) a été identifié et la protéine CFTR caractérisée comme étant un canal d'ions chlorure (Kerem et al., 1989). L'avènement du séquençage à haut débit dans les années 90 a permis de révéler la complexité génétique derrière la mucoviscidose. Près de 1500 mutations sur le gène *cftr* ont été découvertes, toutes responsables de la maladie à des niveaux plus ou moins sévères. De plus, les données de séquençage ont permis de dater l'arrivée probable de la mucoviscidose au cours de l'humanité. En étudiant le nombre de motifs répétés dans les séquences microsatellites retrouvées dans le gène *cftr*, Morral *et al* estiment l'arrivée de la mucoviscidose à l'ère Paléolithique en Europe, il y a au moins 52.000 ans (Morral et al., 1994). Les migrations de populations auraient contribué à la dispersion des différents allèles mutés du gène *cftr* dans le monde.

Bibliographie

II.1.1.2. Manifestations cliniques

La principale caractéristique clinique de la mucoviscidose est l'apparition d'un mucus épais et visqueux qui obstrue les canaux glandulaires où la protéine est normalement présente (**Figure II-1**) (Paranjape and Mogayzel, 2014). Dans sa forme la plus grave, des atteintes viscérales multiples surviennent (poumons, pancréas, foie, petit intestin, canaux déférents). La principale cause de mortalité chez ces patients est les atteintes pulmonaires (Estrada-Veras and Groninger, 2013). L'histoire naturelle de la progression de la maladie au niveau des poumons est une inflammation chronique avec la survenue d'épisodes intermittents de symptômes aigus que l'on nomme les

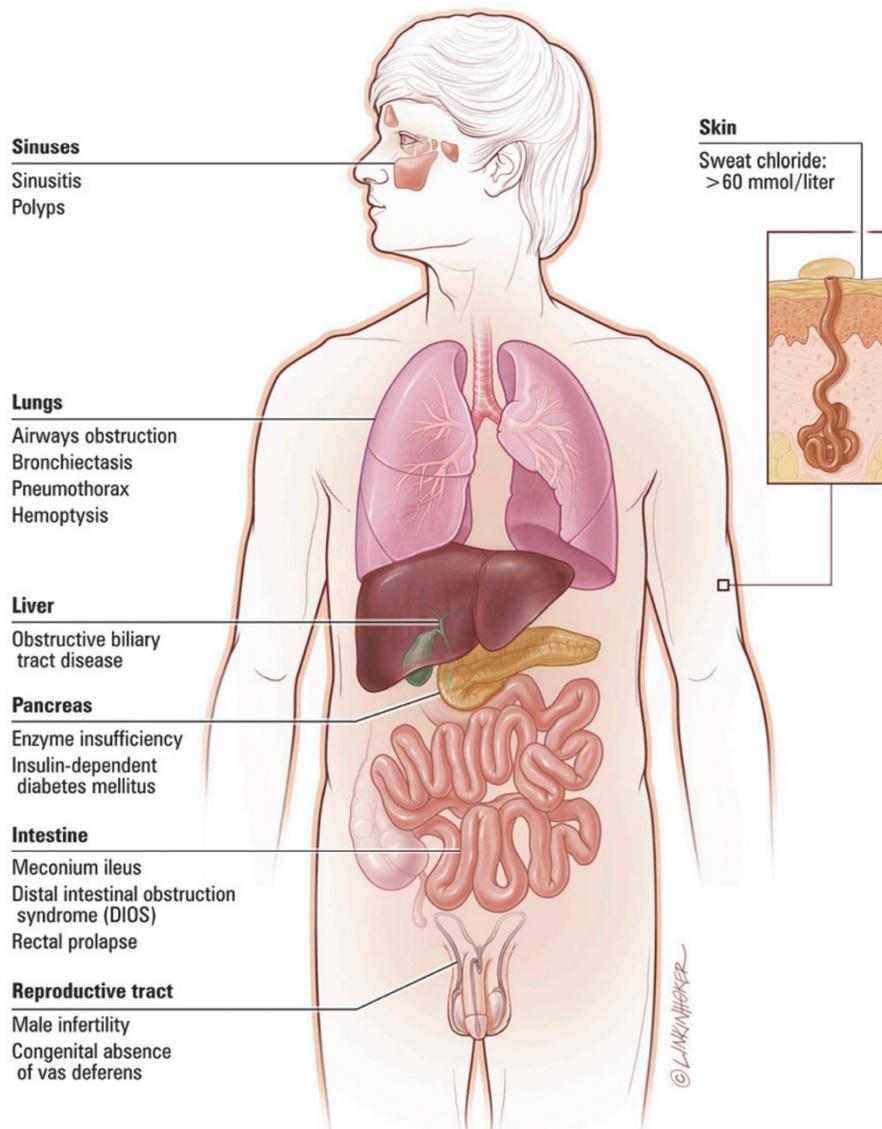


Figure II-1 : Les défaillances multi-viscérales chez les patients atteints de mucoviscidose. L'apparition d'un mucus épais au niveau de nombreux organes impacte leurs fonctions physiologiques. (Paranjape and Mogayzel, 2014)

Bibliographie

exacerbations pulmonaires. Pendant ces épisodes, une aggravation de l'inflammation pulmonaire est observée et se manifeste par l'augmentation de la toux, de malaises, une fatigue et une perte de poids. Bien souvent les épisodes d'exacerbations nécessitent une hospitalisation. A l'heure actuelle, aucun marqueur chimique, physiologique ou histologique ne permet de diagnostiquer un tel épisode. La constatation se fait uniquement par un ensemble de signes et de symptômes qui nécessitent un traitement et/ou une hospitalisation. Les exacerbations peuvent être dues à des agents microbiens (virus/bactéries/fungi) mais l'analyse microbiologique d'expectorations de patients CF pendant les crises ne révèle pas souvent d'anormalités comparé à des périodes calmes (Bhatt, 2013).

Les pancréatites apparaissent chez 85% des personnes atteintes de mucoviscidose (Kerem et al., 1989). Les canaux sécréteurs étant obstrués, les enzymes du pancréas endommagent cet organe. Ces enzymes ne pouvant plus rejoindre l'intestin des insuffisances nutritionnelles se manifestent. De plus, au niveau de l'intestin, l'absence de CFTR fonctionnelle diminue le passage du bol stomacal en contribuant à l'apparition d'occlusions intestinales et à la malnutrition (Egan, 2016).

Les hommes CF présentent une absence congénitale bilatérale des canaux déférents (congenital absence of the vas deferens, CBAVD) qui entraîne une stérilité. La CBAVD touche environ 1 à 2% des hommes sains infertiles mais 95% des hommes CF présentent cette pathologie. Le mucus épais et visqueux bouche les canaux déférents lors de leur formation et le nourrisson est déjà stérile à la naissance. Ces problèmes de stérilité peuvent être contournés par un recours à la fécondation *in vitro* (de Souza et al., 2018).

Avec l'amélioration de l'espérance de vie, notamment grâce à des régimes alimentaires adaptés, des compléments en enzymes pancréatiques et des traitements antibiotiques, les conséquences de la mucoviscidose ne se concentrent plus que sur les territoires pulmonaire et digestif. Des symptômes multi-viscéraux sont apparus chez les patients plus âgés tels que les hépatites, le diabète et les dégénérescences liées à l'os (Jacquot et al., 2016). Les hépatites associées à la mucoviscidose (cystic fibrosis liver disease, CFLD) sont une cause majeure de mortalité. Jusqu'à 70% des autopsies réalisées sur des personnes CF montrent l'apparition d'une cirrhose biliaire primitive. Cette pathologie entraîne la destruction des canaux biliaires situés entre les lobules du

Bibliographie

foie. Les enzymes hépatiques attaquent les tissus périphériques provoquant une hépatite qui peut évoluer en stéatose et en cirrhose (Debray et al., 2017).

Le diabète associé à la mucoviscidose (cystic fibrosis related diabete, CFRD) est aussi une des complications. Environ 10% des enfants CF âgés de 5 à 9 ans souffrent de CFRD et ce pourcentage augmente avec l'âge des patients atteignant 50% pour les personnes de plus de 30 ans. La déficience en production d'insuline entraîne une hyperglycémie chronique qui est responsable d'une résistance à l'insuline sur les organes cibles. Même si les pancréatites peuvent potentiellement expliquer le début d'un diabète, les mécanismes précis de sa survenue sont mal connus puisque toutes les personnes CF ne développent pas de CFRD (Brennan and Beynon, 2015).

Enfin, une dernière pathologie associée à la mucoviscidose présente aussi un problème de santé majeur. Les ostéoporoses et des ostéopénies (cystic fibrosis bone disease, CFBD) ont été fréquemment rapportées. La prévalence de ces pathologies augmente avec l'âge des patients : si elles ne touchent que 5% des enfants, plus d'un patient de plus de 45 ans sur deux en souffre. Ces personnes sont sujettes à des fractures plus fréquentes, à des compressions vertébrales et à un cartilage pulmonaire moins dense qui aggrave les symptômes au niveau des poumons. En effet, la clairance mucociliaire est moins efficace et renforce alors les exacerbations. L'origine de la CFBD est toujours en débat. Les insuffisances du pancréas, le CFRD, les inflammations pulmonaires chroniques, la carence nutritionnelle pourraient expliquer l'apparition d'ostéoporose et d'ostéopénie (Jacquot et al., 2016). Cependant, il semblerait que les CFBD soient plus un problème de métabolisme au niveau des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) qu'un effet secondaire à d'autres manifestations cliniques associées à la mucoviscidose. Des osteoblasts issus d'un patient CF de 25 ans ne montrent plus d'activité CFTR ainsi qu'un déficit dans la production d'ostéoprotégerine (OPG), cytokine importante dans la formation et la régénération osseuse. Cette diminution de OPG peut amener à une diminution de la masse osseuse chez l'enfant et conduire à l'apparition d'ostéoporose et ostéopénie chez l'adulte. L'utilisation d'un correcteur de l'activité de CFTR (miglustat) permet en partie d'augmenter la masse osseuse dans un modèle de souris CFTR (Jacquot et al., 2016).

Bibliographie

II.1.1.3. Les mutations impliquées dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomale récessive la plus commune chez les personnes caucasiennes. Près de 1500 mutations différentes sont impliquées dans la physiopathologie de la mucoviscidose (Dodge, 2015) et peuvent être regroupées en 6 catégories différentes : (1) défaut de transcription/traduction du gène, (2) mauvaise maturation de la protéine et dégradation (3) défaut de régulation de la protéine CFTR, (4) conductance altérée du canal, (5) production/adressage à la membrane partiel, (6) défaut de l'activité de régulation du canal CFTR (Figure II-2). En effet, possédant différents domaines, les mutations peuvent altérer directement la structure de la protéine, ou être impliquées dans un mauvais processing

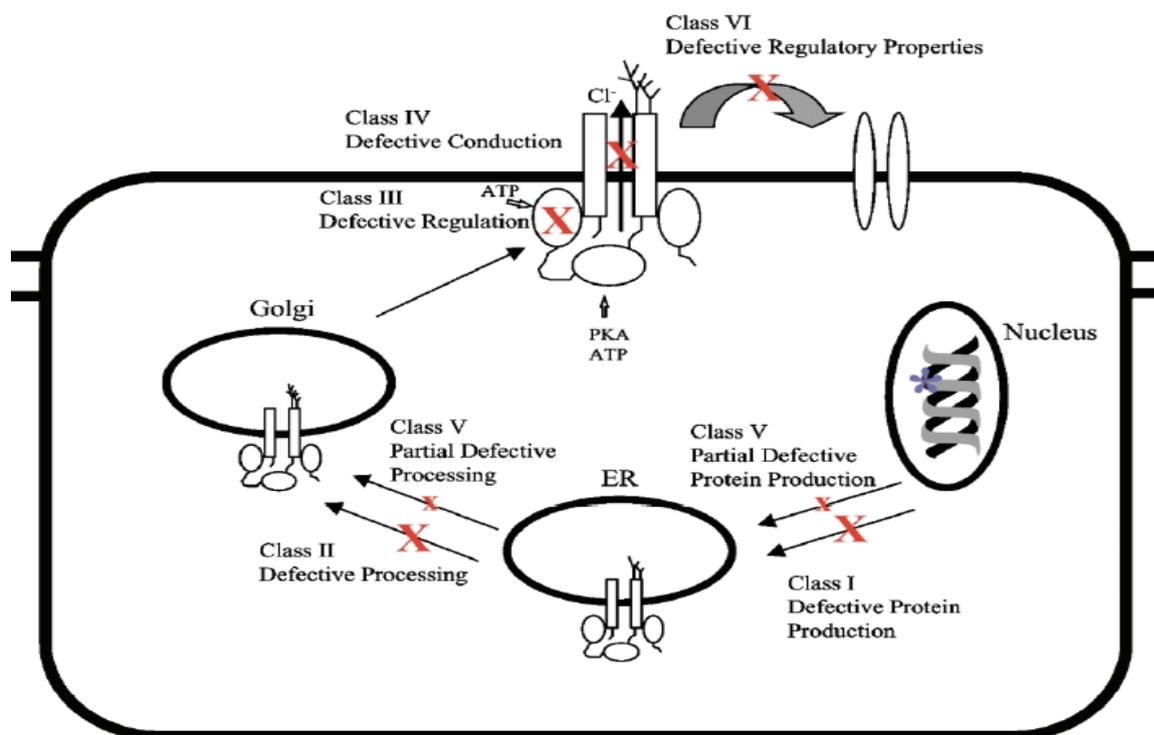


Figure II-2 : Impact des différentes catégories de mutations sur la production de la protéine CFTR. Les mutations peuvent être regroupées dans 6 catégories différentes responsables de perturbations à 6 niveaux distincts : (1) défaut de transcription/traduction du gène, (2) mauvaise maturation de la protéine et dégradation (3) défaut de régulation de la protéine CFTR, (4) conductance altérée du canal, (5) production/adressage à la membrane partiel, (6) défaut de l'activité de régulation du canal CFTR. Modifié de Vankeerberghen et al., 2002.

Bibliographie

(Vankeerberghen et al., 2002). La catégorie 1 regroupe les mutations qui provoquent un arrêt prématuré de la transcription ou de la traduction de la protéine. Dans la majorité des cas, l'apparition d'un codon stop conduit à la production d'une protéine aberrante qui est alors dégradée au niveau du protéosome. Ces mutations apparaissent chez 10% des patients CF (Egan, 2016). La catégorie 2 concerne toutes les mutations qui sont responsables d'un mauvais repliement conduisant à la dégradation de la protéine CFTR lors des contrôles de qualité cellulaires. La catégorie 3 n'est pas impliquée dans la maturation de la protéine mais dans la régulation de son activité. Physiologiquement, CFTR est régulée par l'intermédiaire de son domaine de régulation cytosolique (R domain). Les mutations au niveau de son domaine de régulation diminuent fortement son activité. Les mutations de la catégorie 4, à l'instar de la catégorie précédente, sont aussi liées à l'activité intrinsèque de la protéine. Toutes ces mutations se localisent à l'intérieur du canal et empêchent les ions chlorure de passer. La catégorie 5 regroupe toutes les mutations diminuant la quantité de CFTR fonctionnelle. Elles sont souvent retrouvées au niveau des sites d'épissages alternatifs. Malgré cet impact, une quantité faible mais présente de protéine CFTR peut être produite. Enfin, la dernière catégorie n'affecte pas les propriétés du canal mais impacte ses propriétés régulatrices. La protéine CFTR est souvent associée à d'autres canaux ioniques tels que ENaC (amiloride sensitive epithelial sodium channel) ou encore ORCC (Outwarding Rectifying Chloride Channel). ENaC est impliqué dans l'absorption de sodium au niveau des cellules épithéliales pulmonaires. La protéine CFTR est capable d'inhiber l'activité de ENaC. Même si les données sont contradictoires sur les domaines d'interactions entre ces deux protéines, les mutations de CFTR augmentent la probabilité d'ouverture de ENaC et l'absorption de sodium dans la cellule (Vankeerberghen et al., 2002). Le canal ORCC, un autre canal chlorure, est activé par CFTR. Cette régulation est dépendante de la phosphorylation par la protéine kinase A (PKA). Les mutations de CFTR de cette classe ne permettent plus l'activation de ORCC aggravant alors le déséquilibre en ions chlorure dans les cellules (Vankeerberghen et al., 2002).

Les classes de mutations ne corrèlent que partiellement avec les manifestations cliniques des patients. Il est généralement observé que les mutations de catégorie 1 à 3 sont souvent associées à des bilans cliniques sévères avec des insuffisances pancréatiques, des occlusions intestinales, une détérioration pulmonaire et hépatique rapide et l'absence des canaux déférents chez les hommes. Les catégories 4 à 6, quant

Bibliographie

à elles, sont plus souvent responsables de manifestations cliniques de sévérité moyenne (détérioration des fonctions pulmonaires, hépatiques et pancréatiques moins rapides ou même absentes) (Bombieri et al., 2015). Cependant, une grande variabilité inter-individus est observée ce qui suggère que des facteurs environnementaux et génétiques influencent l'état de santé des patients CF (Castellani et al., 2008). Pour faire le lien entre les catégories de mutations de *CFTR* et leurs conséquences cliniques prédites, les mutations peuvent aussi être scindées en 4 différents groupes suivant le bilan clinique; (A) les mutations responsables de la mucoviscidose, (B) les mutations responsables de symptômes associés à la mucoviscidose (CFRD, CFLD), (C) les mutations sans conséquences cliniques connues à ce jour, (D) les mutations incertaines pouvant provoquer la mucoviscidose (Castellani et al., 2008). Le groupe A regroupe toutes les mutations *cfr* qui ont été fonctionnellement caractérisées et dont le potentiel pathogénique a été clairement identifié. Sur les 1500 mutations recensées, seulement 23 sont classées en groupe A. Ces 23 mutations représentent à elles seules environ 85% des allèles CF dans le monde. Néanmoins, 1% à 1,5% des patients CF possèdent seulement un allèle *cfr* muté mais pas de mutation *cfr* apparente sur le second allèle. Ces hétérozygotes CF montrent que des mutations en dehors du gène *cfr* peuvent aussi conduire à l'apparition de la maladie. L'hypothèse la plus probable serait que ces mutations se situent dans les régions promotrices et introniques du gène *cfr* (non séquencées lors du diagnostic). Des mutations dans d'autres gènes étroitement en lien avec la fonction de CFTR sont aussi incriminées (ENaC) (Castellani et al., 2008). La catégorie B regroupe les mutations dites « borderline » et certaines se recoupent avec la catégorie A. Des mutations chez un patient pourront entraîner un tableau clinique mucoviscidosique classique mais chez un autre patient entraîner uniquement une CBAVD par exemple. L'environnement et l'épigénétique sont le plus souvent incriminés pour expliquer ce phénomène (Castellani et al., 2008). Les groupes C et D rassemblent la quasi-totalité des autres mutations décrites à ce jour. La faible proportion de ces mutations chez les patients et la difficulté à les repérer du fait de l'absence de symptômes cliniques, rendent les analyses difficiles et peu d'études essayent de caractériser leur potentiel pathogénique (Castellani et al., 2008).

Toutes ces mutations ne sont pas présentes à la même fréquence chez les patients CF. La délétion en position 508 de la protéine CFTR (F508del) est retrouvée en moyenne chez 66% des patients CF. Cette mutation de catégorie 2 et du groupe A est la plus fréquemment retrouvée mais une grande variabilité de présence est observée

Bibliographie

au sein de différentes populations. En effet, un gradient de fréquence est observé entre le nord et le sud de l'Europe avec un maximum de 100% dans les îles Féroé (Danemark) et seulement de 24.5% en Turquie. On retrouve aussi un nombre moyen de mutations différentes plus important dans les pays du sud que dans les pays du nord : 25% versus 10.2% (Bobadilla et al., 2002). Les pays du sud sont, historiquement, la porte d'entrée de l'Europe. Les mouvements de populations sont plus denses et le brassage génétique plus élevé. La mutation G542X est la seconde mutation la plus commune en Europe. Elle se situe dans la catégorie 1 et le groupe A de la classification et possède aussi une répartition très particulière. A l'inverse de F508del, on la retrouve plus fréquemment autour du bassin méditerranéen (Sicile, Grèce, sud de la France, Algérie, Tunisie). La fréquence de G542X est en moyenne de 2% dans les pays du nord l'Europe et augmente jusqu'à atteindre 14.4% des mutations sur la côte méditerranéenne de l'Espagne. La distribution géographique dans le pourtour méditerranéen et les études génomiques réalisées émettent l'hypothèse d'une introduction de G542X par la colonisation phéniciennes vers -2500 B.C. Elle se serait diffusée depuis Carthage (Tunisie) avec l'intensification du réseau maritime phénicien (Casals et al., 1993). Enfin, G551D (mutation de 3^{ème} catégorie et du groupe A), est la 3^{ème} mutation la plus retrouvée chez les patients CF. Elle aussi semble posséder une histoire bien particulière. Cette mutation est associée aux descendants des populations celtiques qui possédaient un territoire allant de l'Irlande à la Bretagne. Sous la pression de l'empire Romain et des tribus germaniques, les celtes se sont déplacés dans une petite région au nord des Alpes correspondant actuellement à la République Tchèque. C'est pourquoi, la fréquence de cette mutation est particulièrement élevée dans ces régions (3.8% en République Tchèque) (Bobadilla et al., 2002).

II.1.1.4. Epidémiologie

Le nombre de personnes CF au niveau mondial, difficilement estimable, est évalué à 70.000 (Stephenson et al., 2017). Le dépistage néonatal systématique n'est pas mis en place dans tous les pays pour raisons économiques et/ou sociétales, sous-estimant très probablement le nombre de patients. Aux U.S.A., où un programme de dépistage néonatal est établi, le nombre de cas diagnostiqués est de 29.887 (Bruce Marshall et al., 2018), avec une prévalence de 0.797 pour 10.000 habitants (Farrell, 2008) et une incidence de 1/3900 en moyenne. En Europe (27 pays étudiés), le nombre

Bibliographie

de personnes souffrant de mucoviscidose est de 35.806, avec une prévalence proche de celle des U.S.A. (0.737 pour 10.000 habitants) mais une incidence moyenne plus élevée 1/2000-3000 (Farrell, 2008; Zolin et al., 2019). Cette différence entre l'Europe et les U.S.A. s'explique par un taux d'hétérozygotie et une incidence différente en fonction des populations : caucasiennes 1/25-1/3200; hispaniques 1/46-1/9200 ; africaines 1/70-1/15.000 ; asiatiques 1/90-1/31.000 (Hamosh et al., 1998; Monaghan and Feldman, 1999). D'une part, la diversité des ethnies aux U.S.A. diminue l'incidence de la maladie (forte proportion des personnes hispaniques et afro-américaines) et d'autre part, les pays d'Europe du nord, tels que l'Irlande, possède un taux d'hétérozygotie plus élevé (1/19) et une incidence 2 à 3 fois plus forte que ses voisins européens (Laura Kirwan, 2019). En France, dont le dépistage néonatal systématique a été mis en place en 2002, 7114 patients ont été recensés (prévalence de 1,024 pour 10.000 habitants), (Burgel et al., 2015; Gil Bellis et al., 2019). Une disparité existe aussi au sein de notre pays. Un gradient de prévalence de la mucoviscidose est observable du nord au sud de la France (**Figure II-3**). La Bretagne est la région où la prévalence (12-17 personnes CF/100.000 habitants) de la mucoviscidose y est la plus forte, comparable à celui de l'Irlande. Les migrations des populations Galloises, Irlandaises et de Cornouailles entre le 3^{ème} siècle et le 5^{ème} siècle vers la Bretagne actuelle, sont à l'origine de l'implantation des allèles mutés. Aussi, une forte fécondité, une population peu mobile au marché matrimonial restreint permettent d'expliquer la fréquence et la répartition de la mucoviscidose à la pointe de la Bretagne aujourd'hui (Nadine Pellen, 2012).

En France, le nombre de patients est en constante évolution. En 1992, environ 1500 patients étaient recensés (17,8% d'enfants et 82,2% d'adultes) tandis qu'en 2017, plus de 7000 sont enregistrés dans le registre français de la mucoviscidose dont 55,9% d'enfants et 44,1% d'adultes. La proportion d'enfants n'a fait qu'augmenter témoignant de l'amélioration des soins et du dépistage systématique mis en place. Le ratio homme/femme est quasiment égal à 0,5. La pyramide des âges a une forme classique en cloche indiquant une population stabilisée mais avec une espérance de vie plus courte que la population saine (**Figure II-4**) (Gil Bellis et al., 2019). Néanmoins, l'espérance de vie des patients CF a fortement progressé, due à l'amélioration de la connaissance de la mucoviscidose et de sa meilleure prise en charge. De 1983 à 2017, l'âge médian de survie (l'âge à laquelle 50% de la population d'une année est vivante) est passé de 24 ans à plus de 50 ans (**Figure II-5**). Néanmoins, un certain nombre d'études montre que les hommes ont un meilleur taux de survie que les femmes

Bibliographie

(MacKenzie et al., 2014; Quintana-Gallego et al., 2016; Stephenson et al., 2015). En effet, une étude américaine sur une cohorte de 21.000 patients a montré que les femmes âgées de moins de 20 ans avaient une probabilité de décès 60% plus élevée que celui des hommes (Rosenfeld et al., 1997). Cette disparité peut s'expliquer par deux hypothèses. Une première observation faite en 2012 montre que les femmes sont plus sujettes à être colonisées au niveau pulmonaire par des bactéries pathogènes. La deuxième observation montre que les femmes CF développant un diabète ont un taux de survie plus faible que celui des hommes. Dans les deux cas, les hormones féminines seraient impliquées (Chotirmall et al., 2012; Milla et al., 2005). Cependant des études récentes suggèrent que cette disparité se resserre (Fogarty et al., 2012; Lai et al., 2004; Moran et al., 2009).

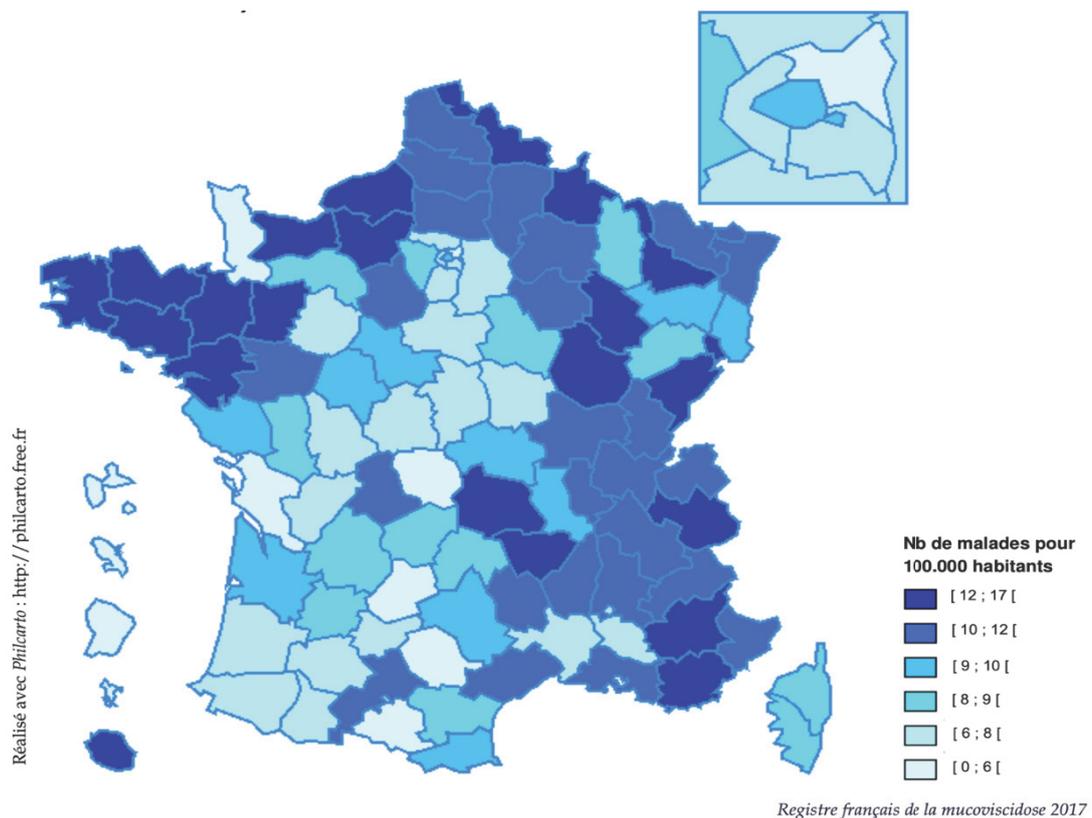


Figure II-3 : Prévalence de la mucoviscidose par département en France. Registre français de la mucoviscidose 2017.

Bibliographie

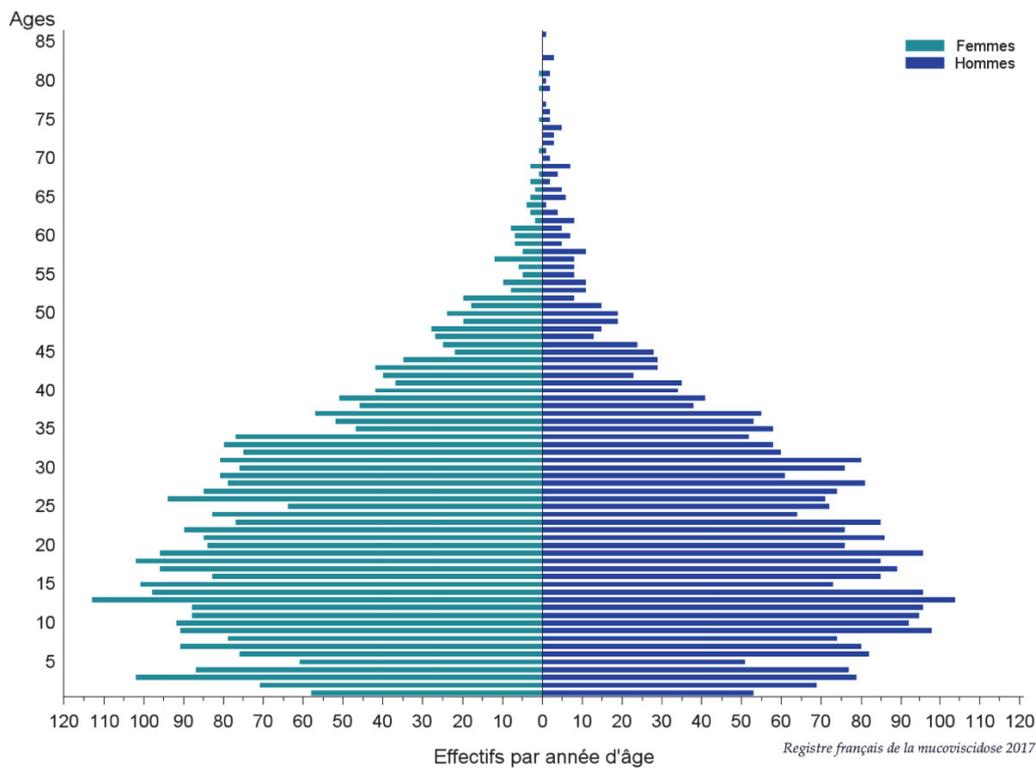


Figure II-4 : Pyramide des âges des patients CF. Une forme en cloche témoigne d'une stabilisation de l'âge. Registre Français de la mucoviscidose 2017.

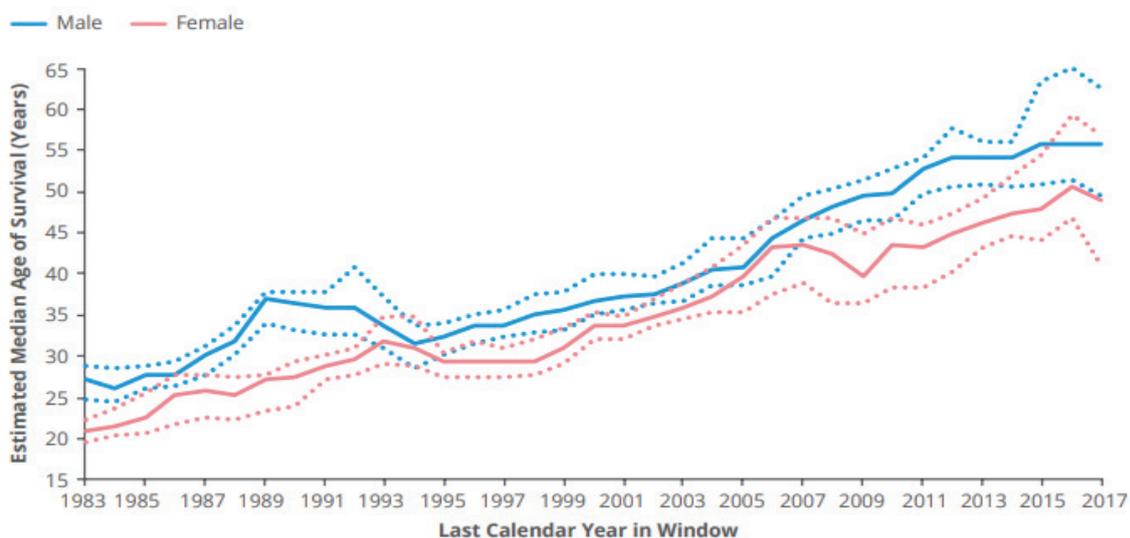


Figure II-5 : L'âge médian de survie des patients CF canadiens de 1984 à 2017 selon le genre. La courbe bleue indique l'âge médian de survie des hommes CF alors que la courbe rouge indique l'âge médian de survie des femmes. Les traits en pointillés bleus et rouges représentent l'écart type autour de la médiane des survies des hommes et des femmes respectivement (The Canadian Cystic Fibrosis Registry, 2017).

Bibliographie

II.1.1.5. Avantage d'être hétérozygote ?

Plusieurs études ont tenté d'expliquer la répartition asymétrique de la prévalence de la mucoviscidose entre les différentes ethnies (caucasien, africain, asiatique...) en mettant en avant l'avantage sélectif de l'hétérozygotie pour le gène *cftr*. Le caractère avantageux de l'hétérozygotie a déjà été décrit pour d'autres maladies génétiques. Ainsi, une mutation dans le gène codant l'hémoglobine *hbs* est responsable de l'anémie falciforme (ou drépanocytose). Les personnes homozygotes *hbs*-/- présentent des troubles hématologiques sévères (anémie, crise vaso-occlusive, syndrome thoracique aigu) et le bilan clinique est souvent défavorable. Cependant, les personnes hétérozygotes *hbs*+/- ne présentent aucun symptôme clinique et deviennent 60 à 80% plus résistantes aux formes de paludisme sévères (Allison, 2009). Le paludisme à lui seul exerce une pression de sélection suffisante pour maintenir un taux d'hétérozygotie dans la population.

La pression de sélection impliquant un pathogène a déjà été investiguée pour expliquer le maintien des populations hétérozygotes pour le gène *cftr*. En 1991, Rodman et Zamudio émettent l'hypothèse que les personnes hétérozygotes *cftr*+/- seraient plus résistantes au choléra. En effet, la toxine cholérique produite par *Vibrio cholerae* active (de façon indirecte) le canal CFTR, responsable de la sortie d'ions chlorure vers la lumière de l'intestin, du déséquilibre ionique et des diarrhées caractéristiques de la maladie. Produisant moitié moins de protéine CFTR fonctionnelle, les individus hétérozygotes seraient alors beaucoup moins impactés par l'action de cette toxine (Rodman and Zamudio, 1991). Cette hypothèse a été confirmée en modèle murin par Gabriel *et al.* En utilisant des souris hétérozygotes *cftr* S489X, moitié moins de sécrétion de fluide est observée lors de l'exposition à la toxine cholérique comparé aux souris homozygotes *cftr*+/+ (Gabriel *et al.*, 1994). Cependant, ces mêmes résultats n'ont pas été confirmés par une autre équipe utilisant des souris de lignées différentes (Cuthbert *et al.*, 1995). De plus, en regardant les données épidémiologiques mondiales, les pays souffrant le plus du choléra ne présentent pas plus d'individus hétérozygotes *cftr*+/-.

Quelques années plus tard, une autre hypothèse impliquant un autre pathogène est émise. Il a été montré que *Salmonella* sérotype Typhi responsable de la fièvre typhoïde utilise le canal CFTR pour rentrer dans les cellules épithéliales intestinales. Ainsi, les personnes hétérozygotes, possédant moins de CFTR à la surface apicale des

Bibliographie

cellules, seraient moins sensibles à l'infection par *Salmonella typhi* (Pier et al., 1998). Pour confirmer cette hypothèse, une étude génétique sur la prévalence de F508del au sein d'une cohorte de 775 patients indonésiens dont une partie est touchée par la fièvre typhoïde a été conduite. Cependant, dû au très faible taux de portage de cet allèle en Indonésie, aucune conclusion n'a pu être émise (van de Vosse et al., 2005). De plus, à l'instar du choléra, les zones géographiques où la fièvre typhoïde est présente, sont de loin les zones où la prévalence de la mucoviscidose est la moins élevée. Il semblerait que ni le choléra et ni la fièvre typhoïde ne puissent expliquer la répartition de la maladie.

Un autre pathogène pourrait bien exercer une pression de sélection suffisante pour maintenir l'hétérozygotie observable aujourd'hui. Une corrélation est faite entre les régions où *Mycobacterium tuberculosis* est présente et le fort taux de prévalence d'hétérozygotes (Bosch et al., 2017; Reichman et al., 2000). De plus, il est aussi observé que les patients CF seraient moins sujets aux infections par *M. tuberculosis* qu'aux infections par d'autres mycobactéries (Bosch et al., 2017; Kilby et al., 1992). Dans son étude de 2006, Poolman et Galvani calculent que la pandémie de tuberculose au 17^{ème} siècle en Europe (20% de la population européenne décimée) a pu fournir une pression de sélection suffisante pour expliquer l'incidence actuelle. Cette pandémie ne s'étant pas propagée en Afrique et en Asie, la prévalence faible dans ces pays là est alors cohérente. Une seconde pandémie au 19^{ème} siècle s'est répandue dans le monde mais, moins virulente que la première, expliquerait la prévalence plus faible en Afrique et en Asie (Poolman Eric M and Galvani Alison P, 2007). Des arguments biologiques viennent en plus renforcer cette hypothèse. En effet, les personnes CF ont une déficience en activité arylsulfatase B (enzyme impliquée dans la synthèse des glycosaminoglycanes). *M. tuberculosis* ne possède pas ce type d'enzyme mais a besoin de l'activité sulfatase de la cellule hôte pour la formation de sa paroi et donc, pour se multiplier. Les hétérozygotes posséderaient alors une activité sulfatase diminuée, réduisant alors la faculté de *M. tuberculosis* à se répliquer en intracellulaire (Tobacman, 2003). Les arguments épidémiologiques, biologiques et géographiques/historiques étayent l'hypothèse que la pression de sélection exercée par *M. tuberculosis* puissent être à l'origine de la répartition de la prévalence de la mucoviscidose dans le monde.

Bibliographie

Des pressions de sélection autres que des pathogènes ont aussi été envisagées. Le mucus pulmonaire est important pour le nettoyage de nos voies aériennes. Un mucus hydraté est un mucus fluide qui évacue efficacement les poussières et bactéries captées. L'eau étant apportée par l'alimentation, un important contrôle de l'équilibre osmotique est en place pour permettre une bonne hydratation de ce mucus. Dans un environnement sec où la quantité d'eau est très limitée, la seule compensation à l'évaporation d'eau du mucus pulmonaire est de diminuer l'absorption d'eau par les cellules épithéliales pour conserver une bonne hydratation du mucus. Les personnes hétérozygotes auraient donc un avantage dans un environnement sec où l'eau est limitée. L'accumulation de sels dans le mucus est normalement empêchée par l'absorption des ions Na^+ et d'eau par le canal ENaC activé par CFTR. Si un gène CFTR est muté, le nombre de CFTR fonctionnelle diminue et les canaux ENaC sont moins activés. L'évaporation de l'eau du mucus va le rendre hypertonique favorisant le passage d'eau du milieu interstitiel/intracellulaire vers le mucus par équilibre osmotique. Le mucus pulmonaire est alors mieux hydraté est donc plus mobile le protégeant alors de la dessiccation. Son travail de nettoyage des bactéries et poussières serait mieux assuré que des personnes homozygotes *cftr* +/+. Il y a plus de 40.000 ans, nos ancêtres ont dû survivre à la dernière ère glaciaire autour de la Méditerranée. Le climat était sec, froid et la concentration en poussière y était 20 à 25 fois plus élevée comparé à aujourd'hui. Ces conditions climatiques pourraient expliquer pourquoi les mutations sur le gène *cftr* ont été sélectionnées en apportant un avantage aux hétérozygotes lors des périodes de glaciations (Borzan et al., 2014). On remarque aussi que cette théorie climatique corrèle avec l'estimation de l'apparition de la mucoviscidose en Europe. Si on essaye de réunir toutes les hypothèses décrites, l'apparition des premières mutations de la mucoviscidose aurait pu être déclenchée par l'ère glaciaire il y a plus de 40.000 ans. La conservation de ces allèles mutés et la distribution asymétrique dans le monde aurait pu être permise par les pressions de sélection engendrées par les bactéries pathogènes un peu plus tard au cours de l'histoire. Bien évidemment, cette théorie reste à être démontrée.

II.1.2. Gène et protéine CFTR

II.1.2.1. Organisation génétique et expression du gène *cftr*

Le gène *cftr* est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31). Il mesure environ 190kb, est composé de 27 exons et est transcrit en un ARNm de 6128 nt (McCarthy and Harris, 2005; Tsui and Dorfman, 2013). Son expression est spatio-temporelle dépendante. Des expériences d'hybridation in-situ de l'ARNm *cftr* provenant de tissus de fœtus humain âgé de 1,5 mois montre une forte expression au niveau des canaux glandulaires du pancréas, des cryptes intestinales et des voies aériennes mais une expression moindre au niveau des canaux déférents, des reins, de l'utérus et ovaires, de la thyroïde, des glandes salivaires et de la vessie (McCarthy and Harris, 2005). Chez les patients CF, la fonction des cellules épithéliales n'est pas compromise au sein des organes où l'expression est faible (sauf les canaux déférents). La fonction CFTR à ce niveau est très probablement compensée par d'autres canaux ioniques présents au sein de ces épithélia. Tous ces profils d'expression sont maintenus après la naissance mis à part au niveau pulmonaire, où des expériences d'hybridation in situ réalisées chez le mouton montrent une décroissance de l'expression de *cftr* jusqu'à la mise bas (McCarthy and Harris, 2005). Chez l'Homme adulte, l'expression de *cftr* au niveau pulmonaire semble être réservée à une faible proportion des cellules totales (1-10%) (Engelhardt et al., 1994).

L'analyse d'une séquence d'environ 4kb en amont de l'exon 1 du gène révèle un taux élevé de GC% avec une absence de boîte TATA, une absence de site de régulation tissu-spécifique mais la présence de multiples sites de début de transcription (TSS). Les ARNm non maturés *in vivo* présentent en fonction du tissu et/ou du temps, un TSS différent. Ainsi dans les poumons adultes de souris, l'initiation de la transcription commence au site -82 tandis que dans une souris âgée de 16j, la transcription commence à -72. Pour les intestins, le +1 de transcription dépend de la localisation de la cellule au sein de cet organe. Au niveau de l'iléum, 2 sites TSS sont utilisés avec le même ratio (-72 et -75) tandis que dans le duodénum, les sites -60 et -19 sont utilisés avec un ratio de 4 :1. Au niveau des testicules, le site utilisé se situe beaucoup plus loin, à la position -549. La régulation tissus-spécifique ne s'effectue donc pas en présence de site de régulation dans le promoteur mais s'effectuerait par la présence de ces TSS multiples (McCarthy and Harris, 2005).

Bibliographie

L'analyse de cette même séquence a permis de caractériser le promoteur du gène *cfr*. Un gène rapporteur sous la direction de cette région plus ou moins tronquée a permis de révéler que le promoteur minimal se situe de -226 à +98 (McCarthy and Harris, 2005). Des multiples sites de fixation de facteurs de transcription ont été retrouvés : AP-1 (Activator Protein 1), SP1 (Specificity Protein 1), CRE (cAMP response element), C/EBP (CCAAT-enhancer-binding-protein), GRE (Glucocorticoid Response Element), HRE (Hypoxia Response Element), NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) (McCarthy and Harris, 2005). Le gène *cfr* est donc sous la régulation de signaux environnementaux comme l'hypoxie (HRE), la concentration d'AMP cyclique (cAMP) intracellulaire (CRE) ou de cytokines pro-inflammatoires (NF- κ B). L'expression du gène *cfr* est aussi régulée par le facteur HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1). L'inhibition de HNF1 dans une lignée cellulaire Capan1 (cellules adénocarcinome pancréatique) montre une diminution de l'expression de *cfr* (McCarthy and Harris, 2005). De plus, des souris knock-out *HNF1* montre une diminution de CFTR au niveau de l'intestin et les souris mâles présentent une absence congénitale bilatérale des canaux déférents, semblable aux patients CF (McCarthy and Harris, 2005). Des séquences appelées « insulator » bornent le gène en 5' et 3' pour empêcher une dysrégulation de son expression par effets polaires des autres gènes proches (moins de 50kb seulement) (McCarthy and Harris, 2005). Enfin, l'analyse de différentes lignées cellulaires exprimant peu le gène *cfr* montrent aussi qu'une augmentation du niveau de méthylation au niveau des îlots CpG du promoteur existe. Ainsi, en plus des différents facteurs de transcription connus à ce jour, une régulation épigénétique par méthylation existerait (Gillen and Harris, 2012; McCarthy and Harris, 2005; Tsui and Dorfman, 2013).

II.1.2.2. Protéine CFTR et fonctionnement moléculaire

La protéine CFTR est partagée par tous les êtres vertébrés. Elle mesure 1480 acides aminés pour un poids de 170kDa. Il s'agit d'un canal ionique ayant une affinité pour le $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$. CFTR présente une structure symétrique typique des membres de la famille des ABC transporters (ATP Binding Cassette) impliqués dans le transport actif pour l'import et/ou l'export de molécules (Figure II-6). Ainsi, la protéine CFTR possède 2 domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) enchâssés dans la membrane lipidique de la cellule. Ces TMD sont eux même composés de 6

Bibliographie

hélices transmembranaires reliées entre elles par 3 boucles extracellulaires et 2 boucles intracellulaires. On retrouve aussi les deux domaines NBD1 et NBD2 (Nucleotide binding domain) qui contrôlent l'ouverture et la fermeture du canal formé par les TMD. Les domaines NBD1 et NBD2 n'ont que 29% d'homologie de séquence en acides aminés entre eux. Ces régions similaires regroupent les motifs spécifiques de liaison de l'ATP et de son hydrolyse (motif walker A et B). NBD1 et NBD2 en s'associant, peuvent fixer l'ATP au niveau de deux sites (Figure II-7) et le dégrader en ADP et pyrophosphate (Vankeerberghen et al., 2002). De plus, cette région agirait aussi comme senseur d'énergie disponible. En effet, NBD1 ne fonctionne uniquement lorsque la concentration intracellulaire d'ATP est supérieure à 5mM (Vankeerberghen et al., 2002). Si la disponibilité en ATP est trop faible, le canal ne s'active pas ce qui permet d'économiser de l'énergie pour d'autres fonctions cellulaires. Cependant, la protéine CFTR possède un domaine de régulation spécifique appelé « R domain » (Vankeerberghen et al., 2002). Ce domaine se compose de 200 acides aminés et n'a pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines. Parmi tous les ABC transporters, la protéine ABCA1 chez les plantes supérieures possède une région similaire en taille

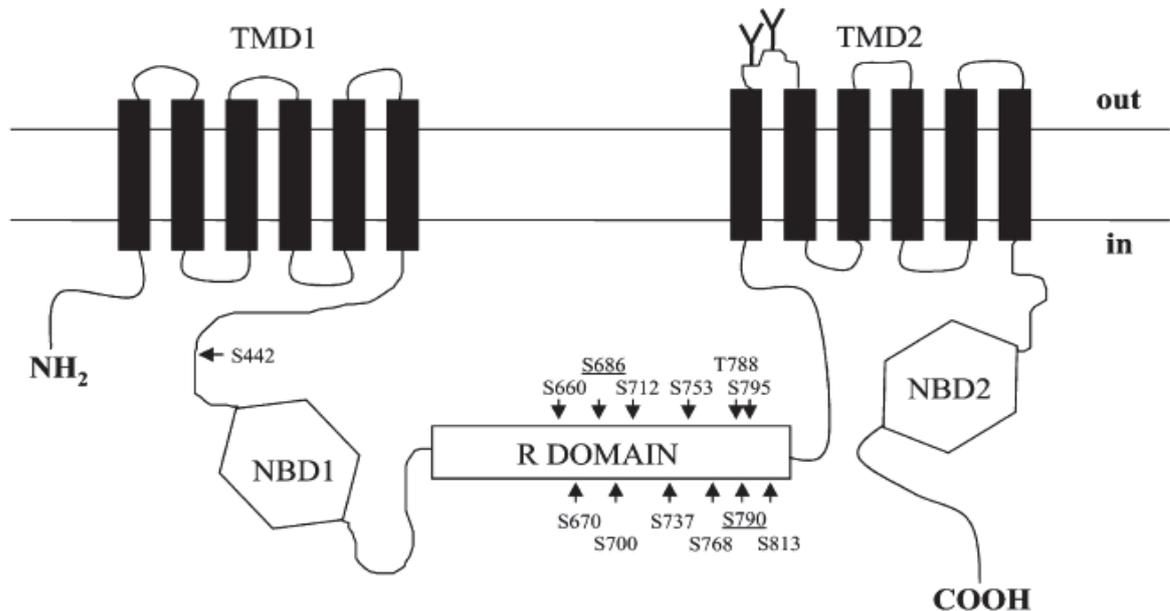


Figure II-6 : Structure en deux dimensions du canal CFTR dans la membrane cytoplasmique d'une cellule. Les flèches indiquent les acides aminés phosphorylables par PKA. Les acides aminés surlignés montrent ceux phosphorylables par PKGII. Les structures en Y sur la 44ème boucle extracellulaire montrent les sites de N-glycosylation de CFTR. TMD : Transmembrane Domain. NBD : Nucleotide Binding Domain. Vankeerberghen et al 2002

Bibliographie

et en résidus de charges (Callebaut et al., 2018). Cette absence d'homologie du domaine R de CFTR pose la question de son origine. Ce domaine possède de nombreux sites de phosphorylation permettant de réguler l'activité du canal. Ainsi, en absence de phosphorylation, la structure en hélice alpha du domaine R permet de lier NBD1 et NBD2 et de jouer le rôle de bloqueur stérique de ces deux domaines (Callebaut et al., 2018). La phosphorylation du domaine R diminue le contenu en hélice alpha réduisant la probabilité de liaison avec les NBDs. Une fois libre, ces régions peuvent se dimériser, fixer l'ATP sur le premier site, l'hydrolyser et permettre une ouverture partielle du canal. Le CFTR est pleinement opérationnel uniquement lorsque le second site de fixation de l'ATP est occupé (Figure II-7). Le canal se referme lorsque le domaine R est déphosphorylé ou lorsque la concentration en ATP intracellulaire chute en dessous de 5mM (empêchant les kinases d'exercer leur activité) (Callebaut et al., 2018; Meng et al., 2017; Vankeerberghen et al., 2002). La PKA dépendant de cAMP et la protéine kinase G de type II (PKGII) dépendant de GMP cyclique (cGMP) sont impliqués dans la phosphorylation du domaine R (Vankeerberghen et al., 2002). L'activité de sur le « R domain » repose sur la présence d'une hormone, la guanyline, présent au niveau

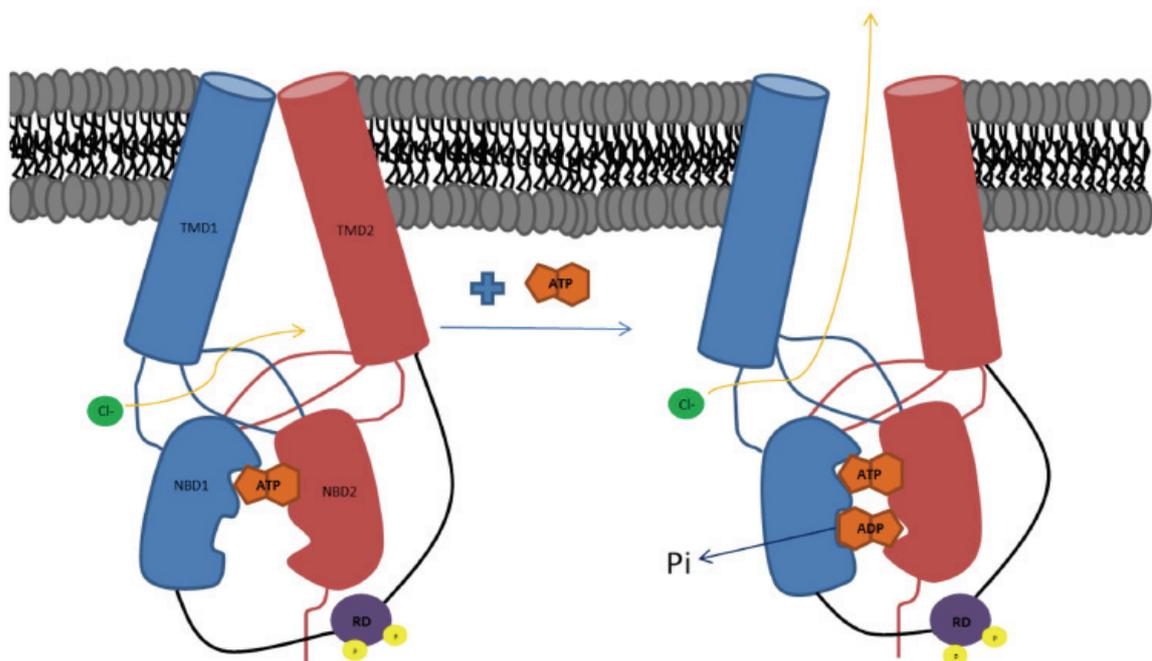


Figure II-7 : Ouverture du canal CFTR. La phosphorylation du R domain (violet) permet de libérer la zone de liaison entre NBD1 et NBD2. La première fixation de l'ATP ouvre partiellement le canal (gauche). L'ouverture complète du canal se produit quand l'ATP au niveau du second site est hydrolysée permettant le passage d'ions chlorures (Cl⁻ en vert). Meng et al., 2017

Bibliographie

de l'intestin et du pancréas (Vankeerberghen et al., 2002). La régulation de l'activité du CFTR sous-entend alors l'utilisation de kinase tissu-spécifique (Kulaksiz et al., 2001). Une phosphorylation par la protéine kinase C dépendant de CMP cyclique a aussi été trouvée *in vitro* mais son activité *in vivo* reste encore inconnue (Callebaut et al., 2018; Meng et al., 2017; Vankeerberghen et al., 2002).

Le canal CFTR subit une modification post-traductionnelle de type N-glycosylation sur sa 4^{ème} boucle extracellulaire (Chang et al., 2008). Au niveau du réticulum endoplasmique, les protéines chaperonnes Hsc70 et calnexin aident au bon repliement tridimensionnel du canal (Chang et al., 2008; Vankeerberghen et al., 2002) qui, si le contrôle qualité est réussi, rejoint l'appareil de Golgi. On estime à environ 30% la proportion de canal CFTR rejoignant cet organite. Une modification de sa glycosylation dans le Golgi est finalement effectuée pour être adressé à la membrane lipidique. Une fois à la membrane, le canal subit des cycles d'endocytose via des vésicules à clathrines, dépendantes de la concentration intracellulaire de cAMP. Ce mécanisme permet de réguler la quantité de CFTR exprimée à la membrane cellulaire. Plus la concentration intracellulaire de cAMP augmente, plus la quantité de CFTR à la surface augmente (Vankeerberghen et al., 2002).

II.1.2.3. Fonctions régulatrices du canal CFTR

Les fonctions de régulations du canal CFTR sur d'autres protéines font toujours débat aujourd'hui. Même si les preuves de l'interaction directe entre CFTR et d'autres canaux sont nombreuses, les techniques employées utilisent des systèmes d'expressions hétérologues (transfection de cellules, système double hybride en levure). Ces modèles reposent sur la surexpression des gènes étudiés, loin des niveaux d'expression que l'on peut retrouver *in vivo* et des interactions non spécifiques sont alors probables. C'est pourquoi, les études mentionnées ci-dessous doivent être regardées avec prudence.

Un rôle de régulation du canal ENaC par CFTR a été suggéré par Stutts et al., en 1995. Quand des cellules sont co-transfectées par CFTR et ENaC, l'activité du canal sodium est fortement diminuée (Stutts et al., 1995). L'hypothèse la plus simple est une interaction aspécifique entre ces deux protéines. En effet, dans le système de Stutts, la surproduction de CFTR peut amener à un déséquilibre anionique intracellulaire

Bibliographie

entraînant une diminution de l'activité de ENaC. Lorsqu'un autre canal chlore, CLC-O, est co-exprimé avec le canal sodium, une inhibition de ENaC est aussi constatée (Bachhuber et al., 2005). Néanmoins, l'étude de la localisation de protéines taguées CFTR et ENaC par immuno-fluorescence révèle une co-localisation à la membrane plasmique de ces deux protéines (Berdiev et al., 2007). Ces résultats ont été confirmés par une analyse en FRET (Flourescence Resonance Energy Transfer) (Berdiev et al., 2007; Ji et al., 2000). Ces études soutiennent l'hypothèse d'une régulation négative de l'activité de ENaC par CFTR via une interaction entre les deux partenaires protéiques. Le canal CFTR posséderait aussi des activités régulatrices sur d'autres canaux ioniques. L'activité de ORCC est diminuée dans des cellules exprimant des protéines CFTR mutées dans le domaine R et/ou NBD1. Les domaines NBD1 et R de CFTR seraient impliqués dans l'activation du canal chlore ORCC par l'intermédiaire de PKA (Mickle et al., 2000; Vankeerberghen et al., 2002).

II.1.2.4. Rôles physiologiques de CFTR

La fonction principale de CFTR est de participer à l'homéostasie ionique des épithélia où il est exprimé et plus particulièrement, dans la sécrétion de sels (McCarthy and Harris, 2005; Meng et al., 2017). Les épithélia possèdent une structure polarisée où le pôle apical est en contact avec l'environnement extérieur (lumière) et le pôle basolatéral est dirigé vers la circulation sanguine. Ces pôles possèdent des rôles bien définis. Le pôle apical a un rôle de barrière physique et chimique empêchant les agents délétères (biotiques ou abiotiques) de pénétrer dans l'organisme. Le pôle basolatéral récupère les nutriments, l'oxygène, les ions et rejette les déchets cellulaires. Le mécanisme général pour le transport d'électrolytes dépend principalement du tissu ainsi que de l'expression des différents transporteurs, pompes et canaux présents à la surface membranaire. Néanmoins, deux types de voies sont possibles pour le transport de composés au travers des épithélia. Le premier est le transport transcellulaire, à travers la cellule, qui requiert soit de l'énergie par hydrolyse de l'ATP (transport actif) ou soit suit le gradient électrochimique (transport passif). Le transport paracellulaire est le passage d'éléments entre les cellules et repose uniquement sur le gradient électrochimique (Saint-Criq and Gray, 2017).

Généralement, l'absorption de sels au niveau d'un épithélium repose sur le transport actif transcellulaire d'ions Na⁺ par le canal ENaC. Ce mouvement de cations

Bibliographie

va engendrer une différence de potentiel, créant ainsi une force motrice pour le passage passif paracellulaire d'ions Cl^- . Les ions Na^+ et Cl^- présent du côté basal, une formation spontanée de sels (NaCl) se produit et un déséquilibre osmotique apparaît (Figure II-8). Pour l'équilibrer, une entrée d'eau passive transcellulaire par les aquaporines ou paracellulaire s'effectue. La sécrétion de sels dépend du transport actif d'ions Cl^- du pôle basal vers le pôle apical qui produit une force motrice pour le mouvement de Na^+ au travers de l'épithélium. Les ions Cl^- accumulés au niveau basal pénètrent dans la cellule grâce au co-transporteur NKCC1 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$). Le canal CFTR, localisé au pôle apical, peut alors prendre en charge les ions Cl^- pour les libérer vers la lumière. La concentration en Cl^- augmentant, une différence de potentiel se crée et le mouvement paracellulaire de Na^+ s'effectue, accompagné du mouvement d'eau pour équilibrer la pression osmotique (Saint-Criq and Gray, 2017) (Figure II-8). Le transport de Cl^- se limite quand la membrane apicale se dépolarise dû à la présence de charges négatives trop importantes. Le canal CFTR, lors de la sécrétion d'ions Cl^- peut aussi prendre en charge les ions HCO_3^- (bicarbonate). Pourtant 5 fois moins conductibles que les ions chlorures, les ions HCO_3^- possèdent un rôle clef dans la régulation du pH au niveau de la lumière des épithélia (Saint-Criq and Gray, 2017). Au niveau des glandes sudoripares, le canal CFTR est impliqué dans l'absorption de sels, à la différence des autres épithélia. En effet la protéine, aussi bien exprimée au niveau apical que basolatéral, permet le passage des ions chlorures depuis la lumière vers le côté basal.

II.1.2.5. Poumon et CFTR : mucus et protection

En plus de son rôle général dans l'homéostasie ionique, le canal CFTR possède un rôle propre à chaque tissu. Les cellules épithéliales pulmonaires (cellules ciliées et cellules de Goblet) sont protégées par une fine couche liquide appelé le liquide de surface respiratoire (ASL : Airway Surface Liquid). Elle est subdivisée en deux composantes au niveau du pôle apical cellulaire : le liquide périciliaire (PCL : Periciliary Layer) et au-dessus, le mucus. Le PCL entoure et protège les cils présents au pôle apical des cellules épithéliales pulmonaires. Ces structures sont essentielles à la clairance mucociliaire, phénomène de battements mécaniques des cils qui permettent d'évacuer le mucus des voies respiratoires. Le mucus est composé de protéines appelées mucine qui, par réticulation, forme un gel souple piégeant les particules inha-

Bibliographie

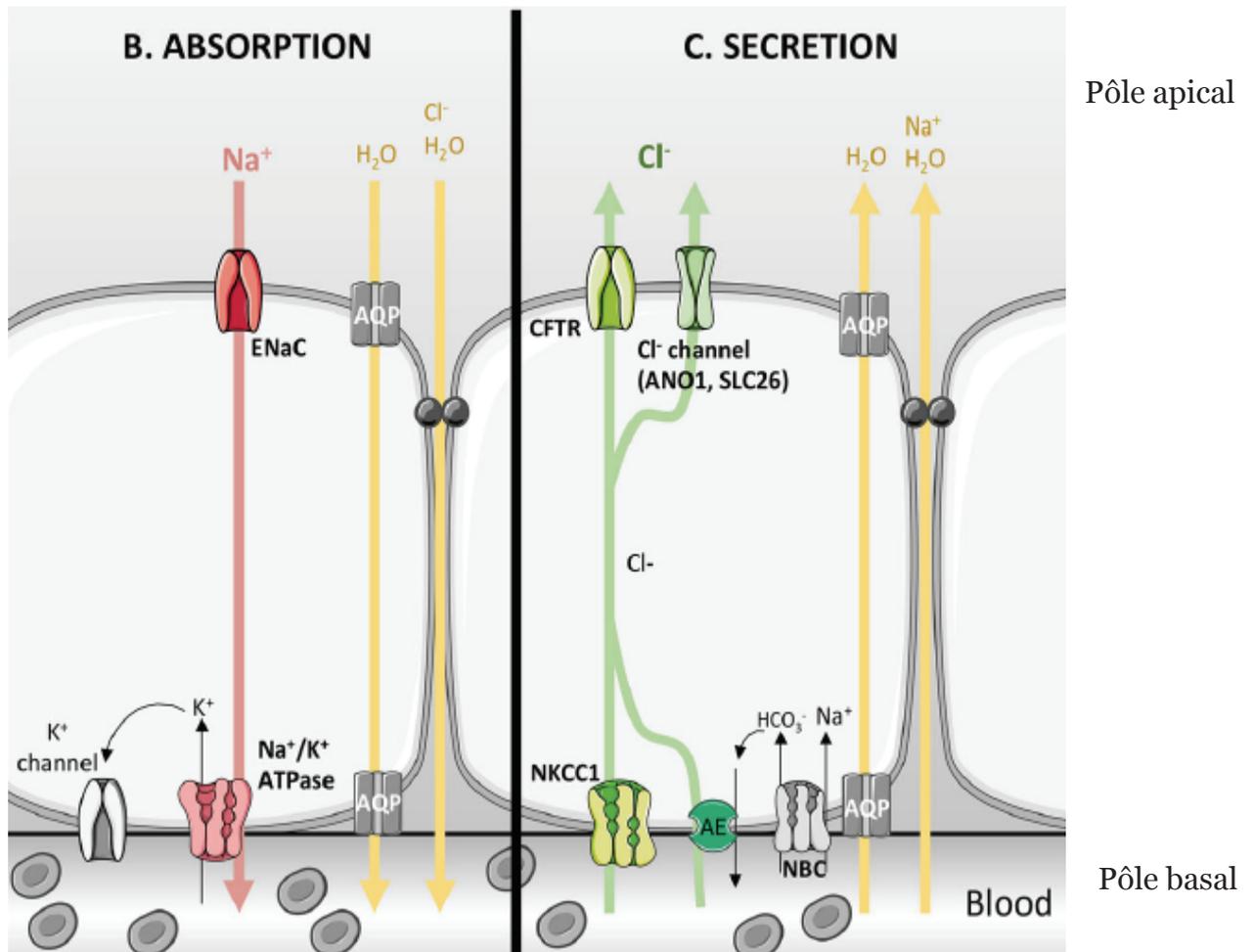


Figure II-8 : Absorption et sécrétion de sels au travers un épithélium. L'absorption de sels est principalement effectuée par le passage d'ions Na^+ et Cl^- de la lumière vers le pôle basal en deux étapes. D'une part, le transport actif de Na^+ (flèche rouge) au pôle apical via le canal ENaC et au niveau basal par le co-transporteur Na^+/K^+ ATPase et d'autre part, le transport passif (flèche jaune) paracellulaire d'ions Cl^- . La sécrétion de sels est conduite par le relargage de Cl^- vers la lumière, lui aussi en deux étapes. Au niveau basal, le canal NKCC1 et des échangeurs d'anions (AE) accumulent les ions chlorures en intracellulaire. Le canal CFTR sécrète ces ions vers la lumière (flèche verte). Enfin la force motrice créée par la différence de potentiel permet le transport des ions Na^+ passivement via la voie paracellulaire. Pour l'absorption ou la sécrétion, l'eau suit le mouvement des ions Na^+ de façon transcellulaire via les aquaporines (AQP) ou de façon paracellulaire. D'après Saint-Criq and Gray, 2017.

Bibliographie

lées et les pathogènes potentiellement présents dans les voies respiratoires.

Pour assurer une bonne fonction de protection et de clairance mucociliaire, la composition chimique de ASL, et plus particulièrement du mucus, est finement régulée. La réticulation des mucines est contrôlée par la concentration en Ca^{2+} et le pH. A l'intérieur des cellules de Goblet (productrices de mucus), la réticulation des mucines doit être inhibée. Les mucines sont contenues dans des granules où la concentration élevée en Ca^{2+} et le pH acide empêche la formation de mucus. Dans la lumière de l'épithélium, les ions calcium et H^+ doivent donc être séquestrés. Le canal CFTR contrôle la sécrétion des ions HCO_3^- qui se complexeront au Ca^{2+} (formation du bicarbonate de calcium) et aux ions H^+ (H_2CO_3) induisant ainsi la réticulation des mucines (Figure II-9) (Chen et al., 2010).

L'hydratation de ASL est un paramètre important pour permettre une bonne clairance mucociliaire. En effet, le mucus doit rester hydraté pour que son élimination soit efficace. Le canal CFTR est responsable de la sortie d'eau vers la lumière de l'épithélium par l'intermédiaire du mouvement des ions chlorures. En effet, la sortie des ions chlorures est accompagnée par la sortie des ions sodium et d'eau par voie paracellulaire (cf II.1.2.4 et Figure II-8). (Saint-Criq and Gray, 2017).

La protéine CFTR possède aussi un rôle important dans la régulation de l'immunité innée au niveau des voies aériennes. Au niveau des épithélia, la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAM) et d'anticorps est une des premières barrières immunologiques employées par notre organisme pour contenir les micro-organismes pathogènes. La régulation du pH par la sécrétion de HCO_3^- via CFTR empêche l'acidification de ASL et permet aux PAMs et anticorps d'être pleinement fonctionnels. Par exemple, la protéase pléiotropique SPLUNC1 abondamment sécrétée possède une activité bactériostatique, antibiofilm et peut se lier aux lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à coloration de Gram négatives. Cette protéine possède aussi une fonction de surfactant et favorise l'hydratation du mucus en inhibant le canal ENaC empêchant la réabsorption des ions Na^+ (Figure II-9) (Pezzulo et al., 2012; Walton et al., 2016).

Enfin, le canal CFTR régule directement le terrain inflammatoire pulmonaire en contrôlant la concentration des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species). Ces espèces possèdent un haut pouvoir oxydatif et peuvent endommager les

Bibliographie

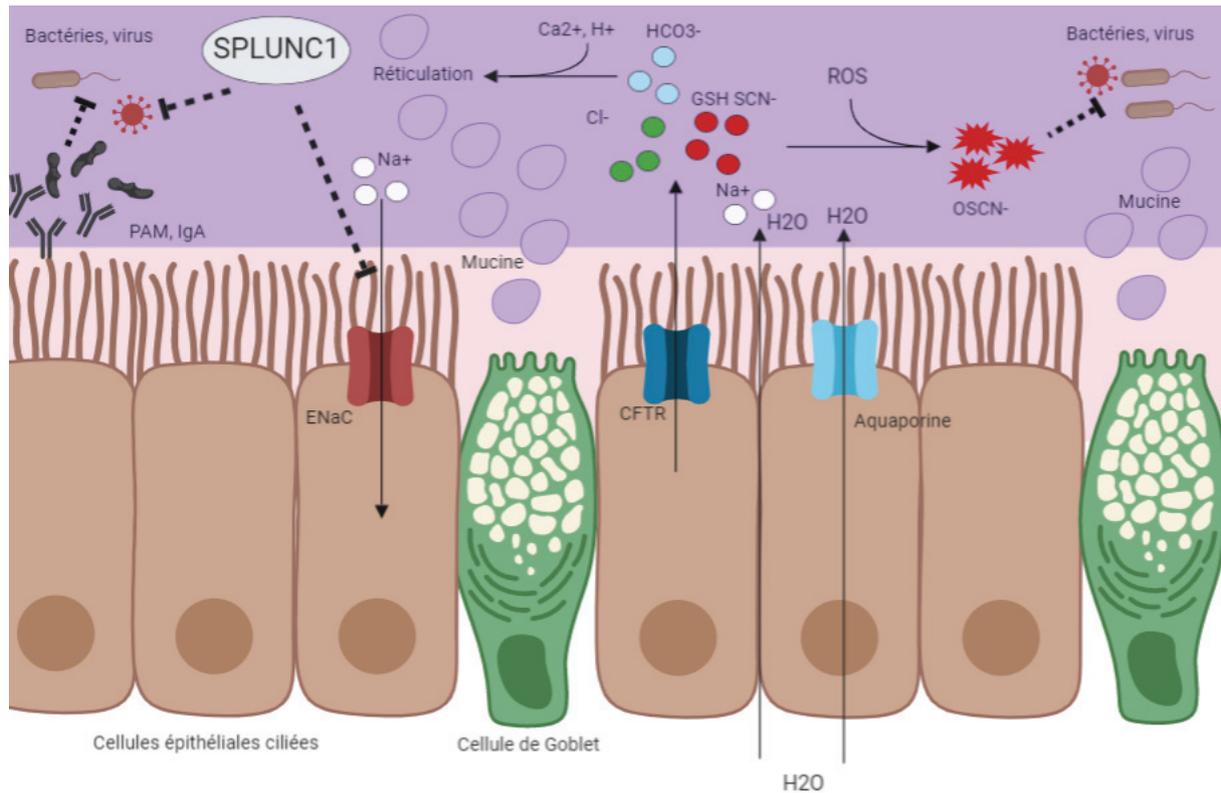


Figure II-9 : Homéostasie pulmonaire médiée par CFTR. Le canal CFTR sécrète les ions Cl^- intracellulaires vers la lumière. Le transport d'eau via les aquaporines qui accompagne la sécrétion Cl^- hydrate le mucus (violet) et le liquide périciliaire (PCL, beige). Le canal CFTR est aussi responsable du transport des ions bicarbonates (bleu clair). Ces ions se complexent avec les ions Ca^{2+} et H^+ présent dans le mucus. La complexation de ces ions par le bicarbonate permet une diminution de leur concentration entraînant la réticulation des mucines issues des cellules de Goblet. De plus, la capture des ions H^+ par le bicarbonate évite l'acidification du mucus et permet aux peptides antimicrobiens (PAM) sécrétés par les cellules épithéliales, aux anticorps IgA résidents et à la protéine SPLUNC1 de fonctionner de façon optimale et d'assurer leur rôle de protection face aux différents agents microbiens. SPLUNC1 empêche aussi la réabsorption des ions Na^+ . Le Glutathion (GSH) et le thiocyanate (SCN^-) exportés par CFTR réagissent avec les espèces oxydatives dérivées de l'oxygène (ROS) diminuant leur concentration et leur pouvoir oxydant sur les cellules. De plus la formation d'hypothiocyanite (OSCN^-) par fixation des ROS avec SCN^- permet aussi de combattre les différents pathogènes.

Bibliographie

structures cellulaires si leurs concentrations ne sont pas régulées. Les ROS peuvent être produites soit de façon endogène témoignant de l'activité cellulaire (respiration, réponse à une infection) ou de façon exogène dû à des facteurs environnementaux pro-inflammatoires (cigarettes, UV...). La protéine CFTR transporte le glutathion (GSH) et le thiocyanate (SCN⁻), qui ont la capacité de se complexer aux ROS et d'inhiber leur activité oxydative sur les structures cellulaires (Roum et al., 1993). De plus, le thiocyanate en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène produit de l'hypothiocyanite (OSCN⁻) possédant une activité antimicrobienne (**Figure II-9**) (Pedemonte et al., 2007).

En conclusion, de part l'export de plusieurs composés différents, le canal CFTR régule la composition chimique de ASL, favorise la clairance mucociliaire et participe à la régulation de l'immunité innée et la production de ROS.

II.1.2.6. Conséquences physiopathologiques de l'absence de CFTR

L'absence de CFTR fonctionnelle chez les patients CF entraîne l'apparition d'un déséquilibre ionique au niveau des épithélia exprimant la protéine. Au niveau des canaux des glandes sudoripares, la perte de l'expression singulière de CFTR au pôle apical entraîne une accumulation des ions Cl⁻ à la lumière, un transport des ions Na⁺ et par conséquent une accumulation de sels dans la sueur (Saint-Criq and Gray, 2017). Au niveau des poumons, du pancréas et de l'intestin, l'absence de mouvement des ions entraîne des conséquences majeures sur la rhéologie du mucus à la lumière des organes impactés. La sécrétion des ions chlorures n'est plus effectuée et ils s'accumulent alors au pôle basolatéral des cellules épithéliales. Par gradient électrochimique, les ions Na⁺ transitent de façon transcellulaire ou paracellulaire. Les molécules d'eau, présentes au niveau du mucus, suivent les ions sodium pour diminuer la concentration en sels formés. Le mucus se déshydrate, stagne à la lumière des organes et devient difficilement mobilisable (**Figure II-10**). Ce phénomène est accentué par l'absence de la sécrétion des ions bicarbonates, qui ne peuvent plus chélater les ions Ca²⁺ et H⁺. La réticulation du mucus devient alors difficile le rendant visqueux. L'absence de pouvoir tampon du pH par le bicarbonate acidifie aussi la lumière. Toutes les protéines sécrétées, qu'elles soient immunitaires (PAMs, IgA) ou participant à la digestion (sucs pancréatiques) ne fonctionnent plus de façon optimale. La conséquence majeure est

Bibliographie

l'apparition d'occlusions intestinales, de malnutrition et d'un terrain infectieux pulmonaire favorisé (Figure II-10). C'est niveau des poumons où la conséquence de l'absence de CFTR est la plus sévère (Ratjen and Döring, 2003). Le défaut de clairance mucociliaire dû à la présence de cet ASL visqueux et épais, favorise la colonisation pulmonaire par des microorganismes normalement non présentes chez des personnes saines.

L'absence de CFTR fonctionnel serait aussi à l'origine d'une réponse inflammatoire exacerbée. Cette hypothèse est étayée par des observations sur des souris gnotobiotiques *cftr*^{-/-} (sans microbiote commensal) qui présentent une inflammation des voies pulmonaires en absence de toute infection bactérienne. Dans de telles conditions, les souris présentent des marqueurs anti-inflammatoires (IL-10) plus faible que le groupe contrôle (Ratjen and Döring, 2003). De plus, une étude sur des prélèvements (sputum) par bronchoscopie chez des patients CF très jeunes révèle une inflammation neutrophilique importante, qu'ils soient colonisés ou non par des bactéries pathogènes (Nichols and Chmiel, 2015). L'absence de glutathion et de thiocyanate empêchant la neutralisation des ROS et induisant une destruction du tissu pulmonaire, pourrait en partie expliquer un phénomène inflammatoire précoce (Figure II-10). Malheureusement aucune étude n'a encore montré à ce jour le rôle direct entre CFTR et inflammation primaire sans infection bactérienne (Nichols and Chmiel, 2015). Par ailleurs, l'acidification des organelles des cellules épithéliales pulmonaires impacte la sialylation des glycoconjugués à la surface des membranes cellulaires et augmente la proportion des molécules asialoGM1, récepteur d'adhésion de nombreux pathogènes bactériens pulmonaires (Ratjen and Döring, 2003). De plus, le canal CFTR a été montré comme étant un des récepteurs d'entrée de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* dans les cellules épithéliales pulmonaires. Une protéine fonctionnelle permet d'internaliser la bactérie pour ensuite la dégrader. Une protéine non-fonctionnelle ou absente permet à cette bactérie de rester libre et de coloniser le mucus (Imundo et al., 1995). Le poumon, en plus des troubles physiopathologiques engendrés par l'absence de CFTR fonctionnel, est le terrain d'infections polymicrobiennes chroniques qui accentuent la sévérité de la maladie des patients CF (Figure II-10).

Bibliographie

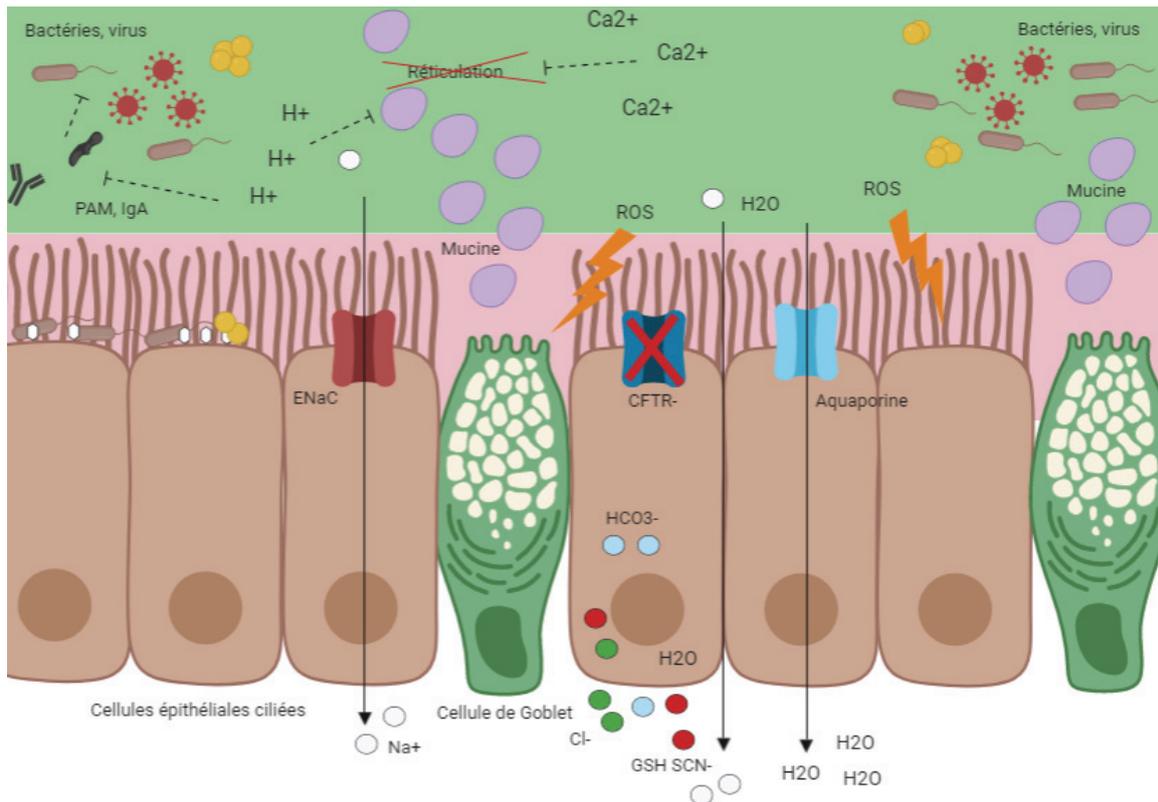


Figure II-10 : Déséquilibre ionique au niveau de l'épithélium pulmonaire chez les patients CF. L'absence de protéine CFTR fonctionnelle empêche la sécrétion d'ions chlorures (Cl^-) et favorise l'absorption d'eau provenant de ASL, conduisant à un mucus (vert) et un liquide périliciliaire (PCL) (rose) déshydratés. Cette déshydratation augmente la viscosité de ASL impactant l'efficacité de la clairance mucociliaire. Les micro-organismes ne sont plus évacués et une colonisation poly-microbienne commence. De plus, l'absence de CFTR annule l'export de bicarbonate (HCO_3^-) et le calcium (Ca^{2+}) résidents est non chélaté. La concentration élevée de Ca^{2+} inhibe la réticulation des mucines sécrétées par les cellules de Goblet rendant le mucus d'autant plus visqueux. La non-complexation des ions H^+ par HCO_3^- augmente l'acidification de ASL et diminue l'efficacité des peptides antimicrobiens (PAMS) et anticorps IgA (symboles noirs). La diminution de l'efficacité de l'immunité innée favorise aussi une colonisation poly-bactérienne chronique. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) sont à l'état libre dans la lumière dû à l'absence du glutathion (GSH) et thyocyanate (SCN^-), normalement exportés par CFTR. Une détérioration de l'épithélium pulmonaire se produit par l'action de ces ROS (éclair jaune). Enfin, la modification des asialoGM1 membranaires d'origine cellulaire par une augmentation de l'acidification des organelles offre de nouveaux récepteurs d'adhésion à des bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (coques jaunes) et *Pseudomonas aeruginosa* (bacilles marrons).

II.2. Les infections polymicrobiennes chez les patients

CF

Les infections pulmonaires chroniques sont responsables de près de 80% de la mortalité et de la morbidité des patients atteints de mucoviscidose (Winstanley and Fothergill, 2009). Les voies aériennes supérieures (cavité nasale, pharynx et larynx) possèdent l'un des microbiomes les plus divers du corps tandis que les voies aériennes inférieures (trachée, bronches et poumons) ont été considérées pendant longtemps comme étant stériles ou colonisées par un microbiote transitoire environnemental rapidement éliminé par le système immunitaire et la clairance mucociliaire (Dickson et al., 2013). Néanmoins, les voies inférieures se révèlent être composé d'un écosystème complexe, dynamique et structuré (Michon and Marchandin, 2015). Chez les patients CF, l'ASL acide, visqueux et épais réduit l'efficacité du système immunitaire et celle de la clairance mucociliaire et une colonisation polymicrobienne survient dès le plus jeune âge.

II.2.1. Le microbiome respiratoire des patients CF

Le microbiome des voies aériennes inférieures est composé de bactéries, de virus et d'espèces fongiques, majoritairement anaérobies ayant parfois un rôle mal défini (Dickson et al., 2013; Willner et al., 2012). A la naissance, les voies respiratoires sont colonisées rapidement par les micro-organismes environnementaux et à partir du microbiome de la mère (Dominguez-Bello et al., 2010). De plus, un passage du microbiote oropharyngé vers les voies inférieures n'est pas non plus à exclure, dû à la proximité anatomique et à la connectivité de ces deux zones (Muhlebach et al., 2018; Venkataraman et al., 2015; Whiteson et al., 2014).

Chez les personnes saines et patients CF, la diversité du microbiome des voies aériennes inférieures est plus faible que le microbiome des voies aériennes supérieures (Carmody et al., 2013; Marsland and Gollwitzer, 2014; Michon and Marchandin, 2015; Ploton et al., 2017). Les bactéries anaérobies sont majoritairement retrouvés réparti en six phyla différents représentant plus d'une 60aine d'espèces chez les personnes saines et, jusqu'à 75 genres chez les patients CF (Marsland and Gollwitzer, 2014; Ploton et al., 2017; Zemanick et al., 2013). On retrouve notamment les bactéries du genre *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium* et *Actinomyces* (Boutin et

Bibliographie

al., 2015; Caverly and LiPuma, 2018; Lamoureux et al., 2019). Néanmoins chez les patients CF, le microbiote pulmonaire est dynamique et évolue en fonction de l'âge. On observe notamment une diminution de la diversité du microbiote corrélée avec une augmentation des exacerbations plus le patient vieillit (Caverly and LiPuma, 2018; Lamoureux et al., 2019; Zemanick et al., 2017). La proportion des bactéries d'intérêt clinique dans les poumons des patients CF évolue en fonction de leur âge. Classiquement, une colonisation par *Haemophilus influenzae* est observée très tôt suivie d'une colonisation par *Staphylococcus aureus*, devenant la bactérie pathogène respiratoire (PRP : Potential Respiratory Pathogen) la plus communément retrouvée jusqu'à l'âge de 20 ans (Figure II-11). Ensuite, *P. aeruginosa* devient la PRP la plus détectée chez les adultes, détrônant *S. aureus*, et est responsable du déclin de la fonction respiratoire. Néanmoins, une forte proportion de personnes co-colonisées par ces deux bactéries perdure (35% selon la tranche d'âge) (Hubert et al., 2013). Ces PRPs sont acquis dans l'environnement du patient et seraient déjà présentes dans les voies aériennes supérieures. Ces bactéries pourraient diffuser quand les mécanismes de défenses locales sont défaillants et participeraient à la chronicité de la colonisation pulmonaire (Boutin et al., 2015). Des colonisations par des souches appartenant au complexe *Burkholderia cepacia* restent rares (1-5% des patients suivant leur classe d'âge) mais sont très redoutées (Figure II-11). Cette bactérie est responsable du « cepacia syndrome » caractérisé par un déclin des fonctions respiratoires rapides et sévère avec une évolution en infection systémique. La résistance naturelle de *B. cenocepacia* aux antibiotiques la rend difficile à traiter. Cette bactérie possède aussi de nombreux facteurs de virulence, de résistance aux antimicrobiens et d'échappement au système immunitaire (Scoffone et al., 2017; Sousa et al., 2011).

De nouvelles bactéries atypiques dites émergentes sont aussi isolées chez les patients CF comme par exemple *Achromobacter* spp, *Pandoraea* spp, *Ralstonia* spp ou *Stenotrophomonas maltophilia*. Cette dernière est une bactérie à coloration de Gram négative trouvée dans les environnements aquatiques qui colonisent près de 15% des personnes CF aux États-Unis et en Europe (Figure II-11). Cette bactérie est naturellement multi-résistante à de nombreux antibiotiques (Brooke, 2012). L'infection chronique par cette bactérie est corrélée à une augmentation de la mortalité et de la nécessité d'une transplantation pulmonaire (Waters and Amin, 2016) Une séroconversion à cette bactérie est aussi observée lors de son arrivée dans les poumons indiquant quand même une réponse immunitaire dirigé contre *S. maltophilia* (Waters

Bibliographie

and Amin, 2016). Il est aussi à noter que des fungi (*Aspergillus/Candida*) et des virus (virus respiratoire syncytial) sont aussi retrouvés même s'ils ne représentent que 1% du microbiome des voies inférieures (Moran Losada et al., 2016; Ploton et al., 2017).

L'impact de la variation du microbiome pulmonaire des patients CF sur l'état clinique est encore mal connu. Il a été montré que la densité bactérienne lors d'exacerbations n'est pas modifiée (Carmody et al., 2015) mais qu'un possible déséquilibre du microbiome, appelé dysbiose est possible. La dysbiose peut être due soit à des agents extérieurs (traitement antibiotique, alimentation) ou liée intrinsèquement à un état physiologique de l'individu. En période d'exacerbation, les poumons présenteraient un microbiome moins divers avec une sur-représentation de certaines bactéries fermentaires (Quinn et al., 2015). Inversement, en période calme, les poumons montreraient un microbiote commensal plus classique (Boutin et al., 2015).

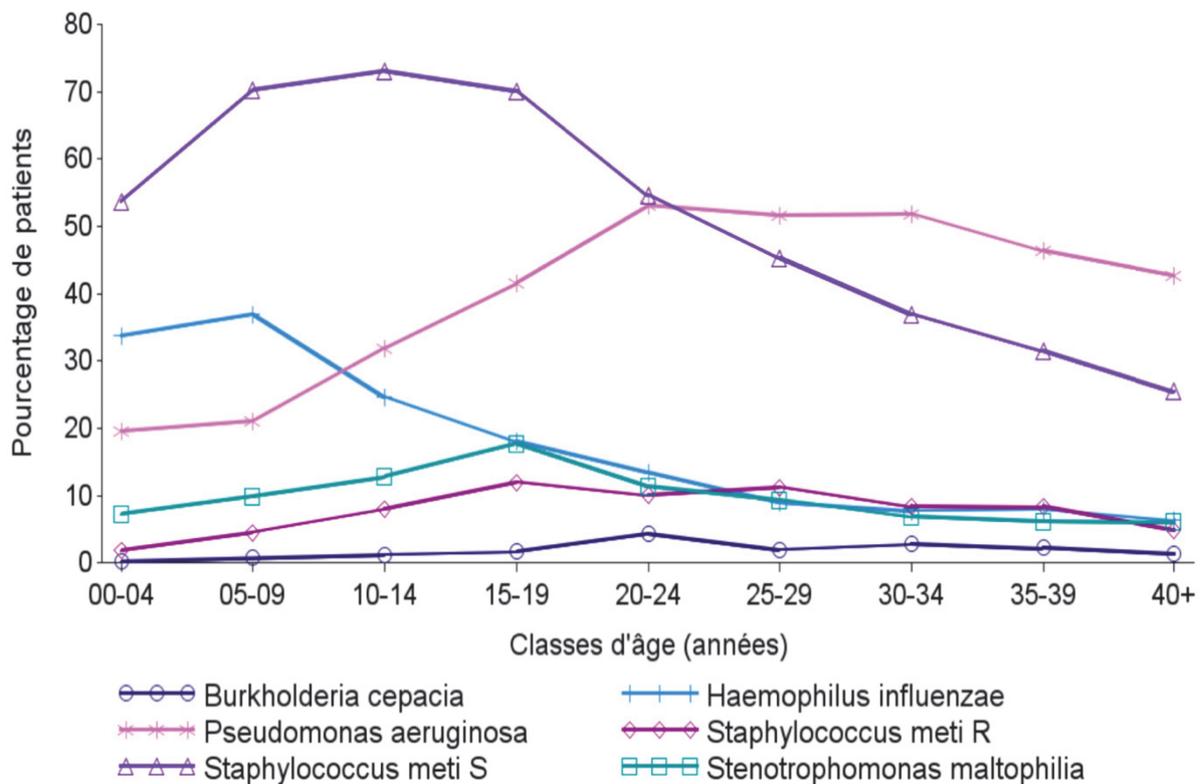


Figure II-11 : Pourcentage de patients CF colonisés par des PRPs selon leur classe d'âge. Registre français de la mucoviscidose 2017.

II.2.2. *Staphylococcus aureus* dans la mucoviscidose

Staphylococcus aureus est la bactérie la plus fréquemment retrouvée chez les patients CF en dessous de l'âge de 20 ans (jusqu'à 80% suivant la classe d'âge) (Gil Bellis et al., 2019). A l'ère pré-antibiotique, cette bactérie était reconnue comme le pathogène majeur des patients CF. Même avec l'avancée de la prise en charge des patients, l'impact de *S. aureus* sur leur état de santé a été démontré de nombreuses fois. Les enfants de moins de 7 ans colonisés par *S. aureus* montrent des marqueurs inflammatoires beaucoup plus prononcés que des enfants CF dont les prélèvements ne montrent aucune présence de la bactérie. En effet, le taux d'IL-8, cytokine pro-inflammatoire classiquement dosée comme un biomarqueur de l'inflammation, est 3 fois plus élevé comparé à des enfants CF non-colonisés par *S. aureus*, le nombre de neutrophiles est 5 fois plus élevé et le taux d'élastase issue des neutrophiles (témoignant de son activité antibactérienne) est 7 fois plus élevé (Gangell et al., 2011). Les enfants CF colonisés par *S. aureus* dans les 2 premières années de leur vie montrent une diminution significative de leur fonction respiratoire comparé à un groupe contrôle (Hudson et al., 1993). De plus chez les patients de plus de 7 ans, la même tendance est retrouvée au niveau des marqueurs inflammatoires avec des fonctions respiratoires déclinantes (Hubert et al., 2013). Une différence de sévérité existe au sein même des clones de *S. aureus*. Une étude sur une cohorte d'environ 20,000 patients CF aux États-Unis a montré qu'une colonisation dans les voies respiratoires par des clones de *S. aureus* résistant à la méthiciline (MRSA : methicilin resistant *S. aureus*) était associée à un taux de mortalité plus élevé comparé aux patients jamais colonisés par MRSA. Cette mortalité peut être expliquée par une inflammation et un bilan clinique général plus sévères chez les patients CF MRSA+ (Dasenbrook, 2011; Hubert et al., 2013). Cette différence n'a à ce jour pas d'explication. En plus de la résistance aux antibiotiques, l'expression de certains facteurs de virulence pourraient être à l'origine des différences de sévérité des souches MRSA+ (Dasenbrook, 2011).

La façon dont *S. aureus* colonise les poumons CF et les facteurs de virulence mises en jeu sont paradoxalement très peu décrits. *S. aureus* s'attacherait plus efficacement au mucus produit par les cellules épithéliales *cftr*^{-/-} qu'au mucus des cellules *cftr*^{+/+} ou issu d'autres pathologies respiratoires (Ulrich et al., 1998). Les facteurs de virulence de *S. aureus* lui permettant de s'implanter dans les poumons

Bibliographie

n'ont malheureusement pas été étudiés mais ces facteurs mis en jeu lors d'une colonisation nasale ont été décryptés (Burian et al., 2010). Le système à deux composants WalK/WalR est important pour la colonisation de l'épithélium nasal en permettant l'expression du gène *sak* (staphylokinase) impliqué dans la dégradation des α -défensines (échappement au système immunitaire) et de *sceD*, essentiel dans la dynamique du renouvellement de la paroi bactérienne. De plus, la colonisation chronique de *S. aureus* nécessite la surexpression des adhésines *clfB* (Clumping factor B) et *isdA* tandis que la colonisation précoce de *S. aureus* semblerait faire intervenir les acides téichoïques de la paroi bactérienne (Burian et al., 2010). Ces données ont été en partie confirmées par une analyse transcriptionnelle (RNAseq) d'un même isolat clinique de *S. aureus* isolé à deux temps différents espacés de 13,2 ans dans les poumons d'un patient CF. Ainsi la souche de colonisation tardive surexprime le gène *sak* ainsi que le gène *spa* impliqué dans l'évasion au système immunitaire en se liant au fragment Fc des anticorps IgG (Windmüller et al., 2015).

Le caractère chronique de la colonisation à *S. aureus* est un autre facteur important dans la pathogénie de cette bactérie et fait intervenir la formation de small colony variants (SCV) (Proctor et al., 2006). Une étude cherchant à mettre en évidence la prévalence des SCVs chez des patients atteints de mucoviscidose a montré leur présence chez 20 patients sur 120 (16,6%) colonisés par *S. aureus* (Besier et al., 2007a). Les patients présentant des SCVs sont plus âgés, possèdent une FEV1 plus faible et nécessitent des traitements antibiotiques par voie intraveineuse plus souvent que des patients colonisés uniquement par un phénotype de *S. aureus* classique (Besier et al., 2007a). Les SCVs présentent un défaut au niveau de leurs processus de respiration et une croissance lente (Melter and Radojevič, 2010). Des phénotypes pathogéniques sont constatés tels qu'une augmentation de la résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Melter and Radojevič, 2010) et antimicrobiens et une augmentation de la persistance de *S. aureus* dans les cellules phagocytaires non professionnelles (Löffler et al., 2014). La caractérisation moléculaire des SCVs montre une inhibition de leur système de quorum-sensing *agr* et des facteurs de virulences associés (hémolysine, pigment) et une surexpression des gènes appartenant au régulon du facteur sigma B (*sigB*) (Melter and Radojevič, 2010). SigB contrôle l'expression d'autres facteurs de virulence, indépendants de *agr*, offrant à *S. aureus* une plus grande capacité d'adhésion, de pénétration et de persistance non seulement dans les poumons (Tuchscher et al., 2015), mais aussi dans les cellules

Bibliographie

(Mitchell et al., 2010) et joue un rôle crucial dans la formation de biofilm (Mitchell et al., 2010, 2013). Chez les patients CF, la plupart des SCV retrouvés sont auxotrophes pour la thymidine (TD-SCV) et montrent une persistance plus longue dans les poumons CF que les *S. aureus* non SCVs (Besier et al., 2007b; Chatterjee et al., 2008). De plus, les TD-SCVs sont plus fréquemment retrouvés chez les patients adultes ayant reçu de long traitement d'antibiotique (triméthoprim-sulphaméthoxazol ; TMP/SMX) (Besier et al., 2007a; Schneider et al., 2008). Le mode d'apparition des SCVs est en effet fortement corrélé aux nombres de traitements antibiotiques. Le TMP/SMX inhibe deux enzymes catalisant des réactions successives dans la chaîne de production de l'acide tétrahydrofolinique, essentielle dans la physiologie de nombreuses bactéries. Au cours des traitements répétés, des mutations sur le gène *thyA*, gène codant une enzyme catalisant l'acide tétrahydrofolinique, sont observées et le phénotype TD-SCV apparaît le rendant résistant au SXT (Besier et al., 2007b). En plus des traitements antibiotiques, d'autres composés sont aussi impliqués dans l'apparition des SCVs. En cas de coculture, la présence de *P. aeruginosa* induit la sélection de population SCVs chez *S. aureus* (Hoffman et al., 2006; Mitchell et al., 2010). Les mutations responsables du défaut de respiration n'ont pas été clairement identifiées dans des isolats cliniques, mais il a été montré que des SCVs sélectionnés consécutivement à une coculture avec *P. aeruginosa* montraient une inhibition de la respiration de 40% par rapport à des bactéries sauvages (Hoffman et al., 2006). La production de 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO) par *P. aeruginosa* permet de sélectionner cette sous-population (Hoffman et al., 2006). HQNO est le produit majeur d'un des systèmes de quorum sensing de *P. aeruginosa*, le système *pqs*. Cette molécule permet d'une part d'inhiber la respiration oxydative de *S. aureus*, ralentissant sa croissance et d'autre part, permet de stimuler l'expression des gènes du régulon SigB et d'inhiber l'expression du système *agr* (Hotterbeekx et al., 2017). L'action pléiotropique de cette molécule permet l'émergence de SCVs chez *S. aureus* et l'établissement de la chronicité (Hotterbeekx et al., 2017). Finalement, dans un modèle souris d'infection pulmonaire chronique, la pré-colonisation par *S. aureus* augmente la capacité à *P. aeruginosa* à coloniser le poumons (Cigana et al., 2017). La façon par laquelle cette colonisation est facilitée reste à être caractérisée mais l'inflammation et la lésion des tissus occasionnés par l'implantation initiale de *S. aureus* pourrait en être la cause. Ces résultats ont été observés lors d'une étude clinique recherchant les facteurs de risques facilitant la colonisation par *P. aeruginosa* chez les enfants CF. Les

Bibliographie

patients dont l'analyse bactériologique montre la présence de *S. aureus* présente plus de risque d'être colonisés par *P. aeruginosa* (risque ratio (RR) 1.30; 95% IC 1.11, 1.52)) (Cigana et al., 2017; Maselli et al., 2003).

II.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

P. aeruginosa est la bactérie majoritaire des patients adultes (34% pour la tranche d'âge 20-24ans et 47,6% pour les 35-39 ans) (Gil Bellis et al., 2019). L'acquisition de *P. aeruginosa* est l'un des prédictors majeurs de la sévérité de la mucoviscidose. La force expiratoire maximale par seconde (FEV₁), témoin de l'état mécanique du poumon, est deux fois moins grande chez les patients colonisés par *P. aeruginosa*, comparé à un groupe contrôle. De plus, le nombre et le temps des traitements antibiotiques sont beaucoup plus importants (Hubert et al., 2013). La quantité d'IL-8 dosée est 8 fois plus grande, et le nombre de neutrophiles ainsi que leur activité élastase atteignent jusqu'à 10 fois le taux contrôle (Gangell et al., 2011). Cette inflammation importante peut être expliquée par le rôle de l'antigène O sur le lipide A de *P. aeruginosa*. Ce composé fait partie intégrante du lipopolysaccharide (LPS), présent sur la membrane externe de la bactérie. Il reconnaît le récepteur cellulaire TLR4, qui par activation de la voie NFκB, est responsable de la production d'IL-8 et de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire (SenGupta et al., 2016).

Le mode de contamination par *P. aeruginosa* reste inconnu et des analyses génétiques montrent que les souches colonisant précocement les poumons proviendraient d'un réservoir environnemental (FitzSimmons, 1993), même si des infections inter-individus sont possibles. Trois variables favorisent la colonisation de cette bactérie : la pré-acquisition de *S. aureus* (RR, 1.30; 95% IC, 1.11, 1.52), l'homozygotie ΔF508 (RR, 2.23; 95% IC, 1.30, 3.80) et être de sexe féminin (RR, 1.85; 95% IC, 1.14, 3.01) (Maselli et al., 2003). D'après une étude sur la cohorte CF irlandaise, les femmes ont un taux de colonisation chronique à *P. aeruginosa* plus élevé que celui des hommes (43,7 femmes VS 31,8% hommes), ont une acquisition de *P. aeruginosa* plus jeune (19,7 ans VS 22 ans) et une proportion de *P. aeruginosa* de phénotype mucoïde plus élevée (60.8% VS 49.4%) (Chotirmall et al., 2012). Cette même étude a montré que les œstrogènes augmentaient la production des alginates via une mutation

Bibliographie

non-sens (p.E20D) sur le gène *mucA*. Les alginate sont responsables du phénotype mucoïde de *P. aeruginosa*, observé en clinique (Chotirmall et al., 2012). Le meilleur taux de chronicité de *P. aeruginosa* chez les femmes reste néanmoins à être expliqué, même si des preuves montrent que le phénotype mucoïde de *P. aeruginosa* augmente le risque de passage à la chronicité (RR, 2.50; 95% IC, 2.11, 3.19) (Heltshe et al., 2018)

Chez plus de 60% des adultes, des infections à *P. aeruginosa* persistent et deviennent chroniques conduisant alors à une sévérité pulmonaire plus grande (Lund-Palau et al., 2016). La chronicité de l'infection est le plus souvent précédée par une période de colonisation intermittente de souches identiques et/ou différentes (Bouvier, 2016) (Figure II-12). Il semblerait que les facteurs de virulence mis en jeu par *P. aeruginosa* évoluent suivant le stade de l'infection. En effet, il a été montré que des souches d'infections précoces de patients adhèrent plus et sont plus internalisées sur un modèle de cellules épithéliales pulmonaires A549 que ces mêmes souches isolées des années plus tard lors d'infection chronique (Hawdon et al., 2010). Les souches d'infections tardives se montrent moins virulentes (moins d'apoptose) vis à vis des cellules A549, ont une capacité plus faible à causer la production de ROS par les cellules mais induisent une plus forte réponse inflammatoire (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Hawdon et al., 2010). Pendant la phase chronique, la majorité des souches de *P. aeruginosa* acquiert des mutations entraînant une diminution de sa motilité et des adhésines (Hawdon et al., 2010), une augmentation du phénotype mucoïde et de son antibiorésistance (Hawdon et al., 2010; Saiman et al., 1996; Smith et al., 2006). Ces différences de réponse peuvent s'expliquer par l'adaptation génétique et phénotypique des souches d'infections tardives à l'environnement pulmonaire hostile. En effet, *P. aeruginosa* mais aussi toutes les autres bactéries présentes chez les patients CF, doivent faire face à de fortes pressions de sélection. Par exemple, la colonisation des voies pulmonaires amène *P. aeruginosa* à s'implanter dans des zones hypoxiques au niveau du mucus proches des conditions microaérobiques et anaérobiques (Worlitzsch et al., 2002). *P. aeruginosa* adapte son métabolisme en surexprimant les gènes *cbb3-2* et *cioA* pour améliorer sa chaîne respiratoire oxydative ou encore utiliser des substrats alternatifs (dénitrification et fermentation de l'arginine par les systèmes *nap*, *nor*, *nos* et *arcABC*) (Alvarez-Ortega and Harwood, 2007; Marvig et al., 2015). La présence du système immunitaire participe aussi à la sélection de souches adaptées. Ainsi, les

Bibliographie

souches d'infection chronique présentent un défaut d'antigène O des lipopolysaccharides de type A (Hancock et al., 1983) ainsi qu'une sous-expression des gènes codant la biogenèse du fimbriae de type 4 (Huse et al., 2010) et du flagelle (Marvig et al., 2015). La diminution de ces facteurs de virulence immunostimulateurs appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) permet notamment d'être moins détecté par le système immunitaire (Kelly et al., 1989). Il est aussi à noter que ce camouflage vis-à-vis du système immunitaire est augmenté par deux mécanismes différents : (i) une meilleure production de biofilm, grâce notamment à la sur-expression de 4 gènes impliqués dans la production (PA5139, PA1592, PA2779, PA4876) (Huse et al., 2010); (ii) l'augmentation de la production d'alginate responsable de l'apparition du phénotype mucoïde par inactivation du gène *muca*

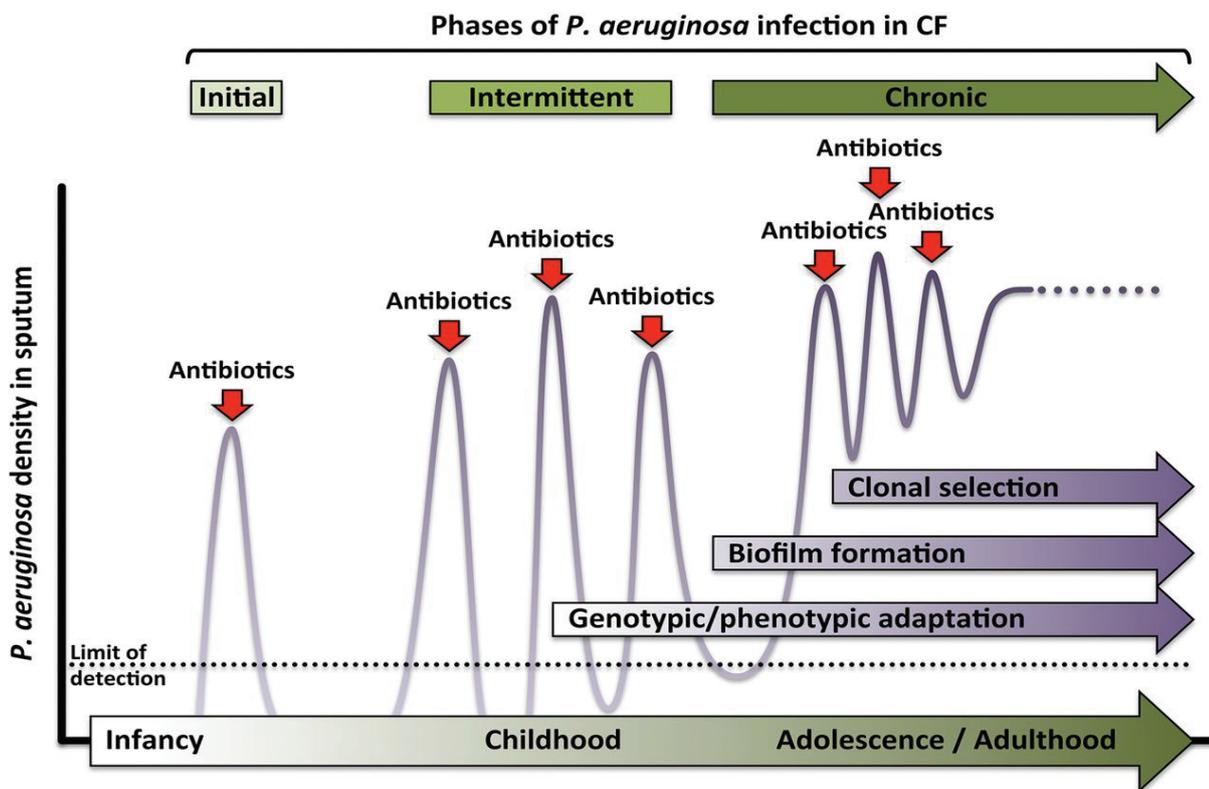


Figure II-12 : Les différentes phases de l'acquisition de *P. aeruginosa* dans les poumons des patients CF. Après une phase d'acquisition initiale, des infections intermittentes se produisent au cours de l'adolescence le plus souvent traitées par antibiotiques. Néanmoins, *P. aeruginosa* parvient à s'implanter durablement dans les poumons et devient alors chronique malgré les traitements. Des adaptations génotypiques et phénotypiques ainsi qu'une sélection clonale se produisent lors de la chronicité (Bouvier, 2016).

Bibliographie

(D'Argenio et al., 2007). Une grande partie de ces mutations et de ces différences d'expression entre souches d'infections précoces et chroniques peuvent être attribuées à l'altération du quorum-sensing de *P. aeruginosa*, *lasR* et *rhlR*. L'inactivation de ces systèmes diminue l'expression de nombreux facteurs de virulence et parallèlement augmente la production de β -lactamase permettant une résistance aux antibiotiques de types β -lactamines (D'Argenio et al., 2007; Smith et al., 2006). L'acquisition de ces mutations s'effectue rapidement après la première colonisation. En utilisant une collection longitudinale d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* DK2, la dynamique d'apparition des mutations lors de la dissémination de ce clone a été étudiée sur 35 années. Les 6 premières années correspondent à une période initiale d'adaptation rapide avec l'acquisition des mutations sur *mucA*, *lasR/rhlR* et *rpoN* et les changements phénotypiques associés. Mais pendant les 29 années suivantes (environ 150,000 générations), les changements génétiques sont limités. Ces mutations sur ces grands régulateurs permettent donc à *P. aeruginosa* d'une part, de diminuer sa virulence et ainsi d'échapper au système immunitaire et d'autre part, de modifier son métabolisme pour s'adapter à l'environnement pulmonaire (Yang et al., 2011a). Cependant, la présence d'autres bactéries colonisant les poumons représente aussi une pression de sélection non-négligeable. Ainsi l'interaction entre deux ou plusieurs partenaires bactériens impact leur mode de vie et doit être prise en compte pour comprendre les infections polymicrobiennes chez les personnes atteintes de mucoviscidose.

II.2.4. L'impact de la co-infection *Staphylococcus aureus*/*Pseudomonas aeruginosa* sur l'état de santé des patients CF

L'ensemble des bactéries formant la communauté poly-microbienne colonisant les poumons CF interagissent entre elles et peut modifier leur comportement vis à vis de l'hôte (Sibley et al., 2008). Étant donné qu'environ 35% des patients CF sont co-colonisés par nos deux pathogènes d'intérêt (Hubert et al., 2013), plusieurs études cliniques ont tenté d'évaluer l'impact de la co-infection *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur l'état de santé des patients CF. Le suivi longitudinal d'enfants <2ans sur une période allant jusqu'à 13,2 ans après leur inclusion a montré que les enfants co-infectés par *S.*

Bibliographie

aureus et *P. aeruginosa* possédaient un plus haut taux de IgG sérique et un plus faible score de Basfield (indiquant l'état pulmonaire général par radiographie) comparés aux groupes mono-infectés par *S. aureus* ou *P. aeruginosa*. De plus, 5 années après leur inclusion, ces enfants co-infectés présentaient une spirométrie (FEV₁) plus faible et un score de Basfield toujours plus bas comparé au groupe mono-infecté par *S. aureus*. Aussi, leur taux de survie à 10 ans est quasiment deux fois plus faible que les groupes mono-infectés (Hudson et al., 1993). D'autres études montrent que les personnes CF co-infectées présentent une plus grande inflammation pulmonaire (taux IL-8, comptage des neutrophiles) comparées aux personnes non-infectées et/ou mono-infectées (Gangell et al., 2011; Sagel et al., 2009). L'ensemble de ces études montrent un caractère inflammatoire plus prononcé lors d'une co-infection par *S. aureus* et *P. aeruginosa* comparé à des infections uniques.

Cette augmentation peut être expliquée par une modification de la virulence de *P. aeruginosa* en présence de *S. aureus*. Il a été montré qu'en présence d'autres bactéries à coloration de Gram positives telles que *S. aureus*, 4 facteurs de virulence majeurs de *P. aeruginosa* sont surexprimés (Duan et al., 2003; Sibley et al., 2008) : LasB, les rhamnolipides, les exotoxines de la famille Exo et les phénazines. LasB est une protéase capable de digérer le surfactant pulmonaire, de dégrader des enzymes antimicrobiennes telles que le lysozyme et la transferrine et d'impacter la clairance muco-ciliaire en diminuant le mouvement des cils. De plus, LasB prévient la phagocytose par les macrophages et son activité protéase conduit à des dommages au niveau des tissus, entretenant l'inflammation pulmonaire (Figure II-13) (Strateva and Mitov, 2011). Les rhamnolipides sont des glycolipides qui interagissent avec l'activité de surfactant du poumon et avec la réponse immunitaire en perturbant le chimiotactisme des leucocytes, la fonction des macrophages et aussi le battement des cils. Les rhamnolipides augmentent aussi l'inflammation en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) (Figure II-13) (Jensen et al., 2007; Soberón-Chávez et al., 2005). Une réponse inflammatoire excessive est aussi induite par les exotoxines ExoT, ExoS et ExoY par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III (T3SS) (Figure II-13) (Hauser, 2009). Enfin le 4^{ème} type de molécule sont les phénazines dont la pyocyanine, responsable de l'hyperplasie des cellules de Goblet (Hao et al., 2012). Ce pigment crée aussi un déséquilibre entre la balance des lymphocytes T helper TH1 et TH2, aboutissant à une surproduction de cytokines TH2

Bibliographie

IL-4 et IL-13 et une augmentation de l'infiltration des macrophages dans l'épithélium pulmonaire (Figure II-13) (Caldwell et al., 2009).

L'activation des systèmes de quorum-sensing PQS et LasR de *P. aeruginosa* par la détection d'autoinducer -2 (AI-2) et du N-acetyl glucosamine (GlcNAc) présent à la paroi de toutes les bactéries à coloration de Gram positives serait en grande majorité responsable de l'activation de ces facteurs de virulence (Korgaonkar et al., 2013; Whiley et al., 2014). Ainsi cette modification de la virulence de *P. aeruginosa* en présence d'autres bactéries pourrait expliquer le tableau clinique plus dramatique chez les personnes co-infectées. Néanmoins, plusieurs études ne montrent pas d'effet de la

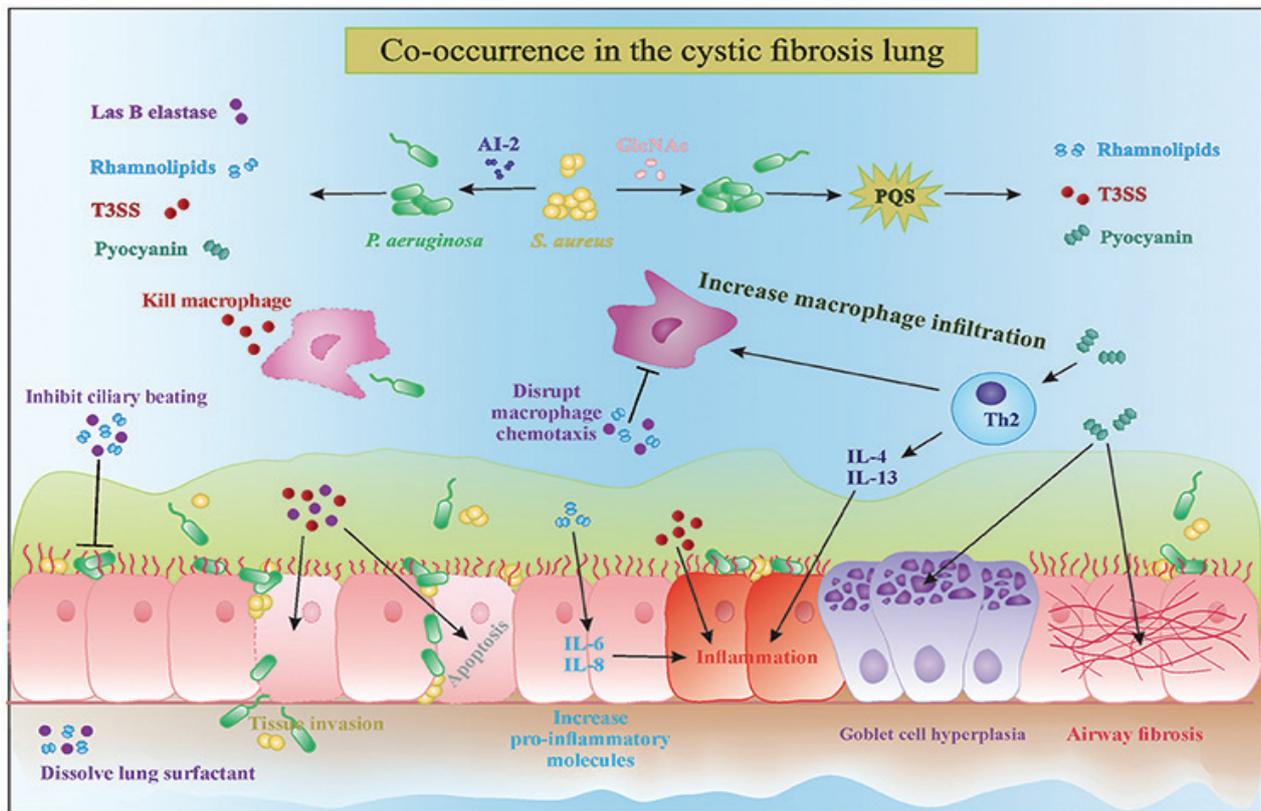


Figure II-13 : Impact de la communauté bactérienne sur la virulence de *P. aeruginosa* chez les patients CF. La présence de bactéries à coloration de Gram positives (e.g *S. aureus*) augmente la production de 4 facteurs de virulence majeurs de *P. aeruginosa* : LasB, rhamnolipides, phénazines (pyocyanine) et exotoxines (i.e T3SS). Cette induction est possible par la production AI-2 pouvant provenir de différentes espèces bactériennes ainsi que la détection de GlcNAc, constituant du peptidoglycane des bactéries à coloration de Gram positives. Une augmentation de l'inflammation et un échappement au système immunitaire est la principale conséquence (Hotterbeekx et al., 2017).

Bibliographie

co-infection sur la sévérité de la maladie. Ahlgren et al montrent que la co-infection ne détériore pas plus les caractéristiques cliniques (FEV1%, Indice de Masse Corporelle (IMC), nombre d'exacerbation) qu'une mono-infection par *P. aeruginosa* (Ahlgren et al., 2015). Chez des patients CF de plus de 7 ans, la corrélation entre un déclin respiratoire et la co-infection n'est pas non plus retrouvée. En effet, l'étude menée sur 419 patients CF indique que la co-infection reste plus sévère qu'une mono-infection par *S. aureus* mais moins qu'une mono-infection par *P. aeruginosa* (Hubert et al., 2013). Cependant, en distinguant les clones sensibles à la méthiciline (MSSA : methiciline sensible *S. aureus*) et MRSA, on retrouve que la co-infection par MRSA/*P. aeruginosa* est responsable d'un plus grand déclin dans la FEV1. Ainsi, la co-infection MSSA/*P. aeruginosa* montre un tableau clinique général meilleur qu'une mono-infection par *P. aeruginosa*. Les résultats de Cios et al confirme que les personnes mono-infectées par *P. aeruginosa* ont un plus haut taux d'hospitalisation annuel (1,09) comparé aux personnes co-infectées (1,02), aux personnes MRSA+ (0,62) et personnes MSSA+ (0,40), même si ces différences restent faibles (Cios et al., 2019a).

Par conséquent, des données controversées existent sur l'impact de la co-infection *S. aureus/P. aeruginosa* et l'état de santé des patients. D'autres études doivent être menées pour pouvoir au mieux caractériser les patients CF suivant leur bilan microbiologique et ainsi améliorer l'efficacité de la prise en charge.

II.3. Les interactions entre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons des patients CF

Dans le contexte de co-infection entre nos deux bactéries d'intérêt chez les personnes CF, un modèle, basé sur les observations cliniques et les données in vitro, explique que les souches d'infections précoces de *P. aeruginosa* sont en compétition avec *S. aureus* tandis que les souches d'infections tardives perdent cette faculté de virulence vis-à-vis de *S. aureus* (Hotterbeekx et al., 2017; Limoli and Hoffman, 2019; Michelsen et al., 2016). L'état de compétition a bien été caractérisé tandis que l'état de coexistence, succédant à la compétition dans ce modèle, reste à ce jour mal décrit (Baldan et al., 2014; Limoli et al., 2017; Michelsen et al., 2016).

II.3.1. L'état de compétition

L'étude de la prévalence des infections à *S. aureus* et à *P. aeruginosa* dans les poumons des patients CF montre une disparition concomitante de *S. aureus* lors de l'apparition de *P. aeruginosa* (Figure II-14). Cette dynamique particulière suggèrerait l'effet antagoniste de *P. aeruginosa* possédant tout un arsenal de molécules pouvant amener à l'éradication de *S. aureus*. On distingue 4 types d'action différents : l'action directe où les molécules de *P. aeruginosa* vont déréguler la physiologie de *S. aureus*, l'action anti-biofilm médiée par les rhamnolipides, une compétition nutritionnelle qui prive *S. aureus* de composés essentiels à sa croissance et enfin, *P. aeruginosa* peut manipuler le système immunitaire de l'hôte pour éradiquer *S. aureus*.

II.3.1.1. Action directe

Plusieurs molécules produites par le bacille ont déjà été décrites *in vitro* comme étant anti-bactériennes (Brito et al., 1989; Young, 1947). En 1956 Lightbown and Jackson, isolent pour la première fois à partir de surnageant de *P. aeruginosa* un composé fortement anti-staphylococcique (Lightbown and Jackson, 1956). Ce composé, HQNO, a ensuite été détecté plus tard chez des souches cliniques CF de *P. aeruginosa* et dans le sputum des patients infectés, montrant que cet effet anti-staphylococcique pouvait se produire *in vivo* (Hoffman et al., 2006; Machan et al., 1991, 1992). HQNO est un composé intermédiaire du quorum-sensing PQS de *P. aeruginosa* (Williams and Cámara, 2009). Il ne possède pas d'activité anti-staphylococcique à proprement parler mais ralentit la croissance de *S. aureus* en inhibant le système du cytochrome nécessaire à sa respiration oxydative (Hotterbeekx et al., 2017). Une autre molécule possède le même effet : la pyocyanine inhibe cytB, une protéine impliquée dans la chaîne du cytochrome (Voggu et al., 2006). La pyocyanine est détectable dans le sputum des patients CF à des concentrations suffisantes pour impacter la respiration de *S. aureus* (Figure II-14) (Wilson et al., 1988).

Les quorum-sensing Las/Rhl de *P. aeruginosa* produisent des N-acyl-homoserine lactones (AHLs). De taille variable, ces molécules consistent en un anneau homoserine lactone N-acylé par un lipide acylé et d'une chaîne carbonnée composée de 4 à 18 atomes de carbone. La croissance de *S. aureus* est inhibée par ces AHLs de

Bibliographie

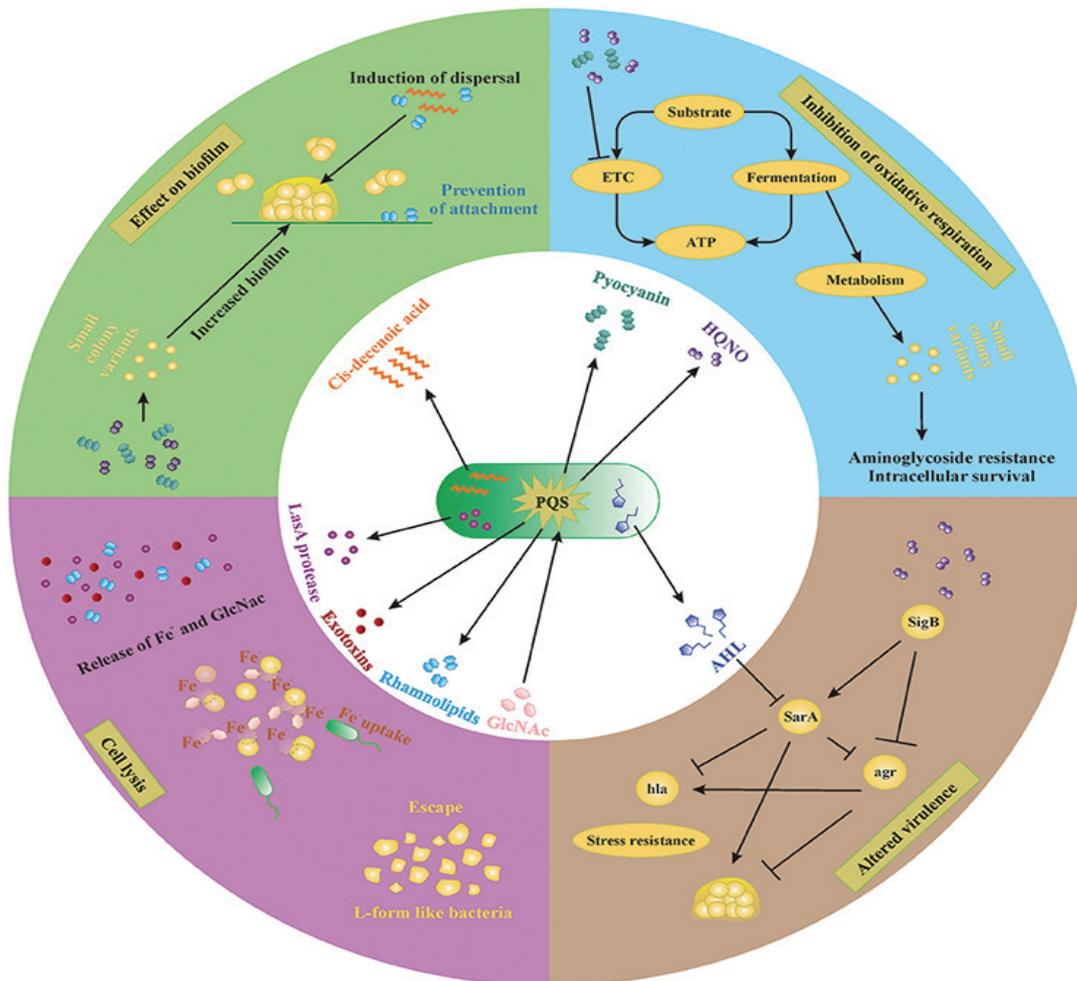


Figure II-14 : État de compétition entre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Par l'intermédiaire de ses quorum-sensing (PQS, Las et Rhl), *P. aeruginosa* est capable de produire un large spectre de molécules inhibant la croissance de *S. aureus*. HQNO et les pyocyanines sont responsables de l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons au niveau des cytochromes, ralentissant la croissance de *S. aureus*. Les AHLs (N-Acyl homoserine lactones) sont produites par les quorums sensing Las/Rhl et impactent négativement la croissance de *S. aureus* de façon dose-dépendante et altèrent sa virulence en inhibant son quorum-sensing agr. La protéase LasA lyse directement *S. aureus* et les rhamnolipides promeuvent la dispersion du biofilm en concert avec l'acide cis-2-decanoïque (Hotterbeekx et al., 2017).

Bibliographie

manière dose dépendante mais le mécanisme d'action reste à être découvert (Qazi et al., 2006). A concentration sub-inhibitrice, ces AHLs inhibent le quorum-sensing de *S. aureus* diminuant la production de ses facteurs de virulence (Figure II-14) (Qazi et al., 2006).

L'action inhibitrice de *P. aeruginosa* peut aussi faire intervenir des protéases lysant directement la paroi de *S. aureus*. LasA, ou staphylolysine, est une protéase extracellulaire capable de tuer *S. aureus* en clivant les liaisons pentapeptidiques de sa paroi bactérienne (Kessler et al., 1993). Finalement, *P. aeruginosa* produit des rhamnolipides dont la nature hydrophobe de ces molécules leur permette de s'enchâsser à l'intérieur des membranes de *S. aureus*, la perméabilisant et causant la fuite du contenu intracellulaire. Les bactéries à coloration de Gram négatives sont moins sensibles aux rhamnolipides dû à la présence du LPS, chargé négativement et hydrophobe, dans la membrane externe (Figure II-14) (Soberón-Chávez et al., 2005; Sotirova et al., 2008).

Une grande partie de ces facteurs de virulence est contrôlée par les quorum-sensing de *P. aeruginosa* (notamment les systèmes PQS et Las/Rhl) qui eux-même peuvent être activés par la présence d'autres bactéries telle que *S. aureus* (Korgaonkar et al., 2013). Indirectement la présence de *S. aureus* est responsable de sa propre disparition (Hotterbeekx et al., 2017)

II.3.1.2. Action anti-biofilm

S. aureus et *P. aeruginosa* ne sont pas uniquement retrouvés en forme libre. Bien au contraire, les bactéries forment des matrices de polymères appelées biofilm. Les biofilms ont été reconnus comme étant important dans l'établissement des infections chroniques comme dans la mucoviscidose (Bjarnsholt, 2013). Sous forme de biofilm, les bactéries possèdent ainsi plusieurs avantages dont l'échappement au système immunitaire et l'augmentation de leur antibiorésistance (dû à une pénétration moindre des antibiotiques ainsi qu'à un métabolisme ralenti des bactéries) (Limoli et al., 2015). *P. aeruginosa* peut déstabiliser les biofilms établis par d'autres bactéries et notamment par *S. aureus*, par la production de l'acide cis-2-decanoïque, même si le mécanisme exact reste encore inconnu. De plus, les rhamnolipides ont aussi la capacité de promouvoir la dispersion du biofilm et d'inhiber l'adhésion de *S. aureus* à des

Bibliographie

microplaques de polystyrène *in vitro* de façon dose dépendante (Figure II-14) (Zezi do Valle Gomes and Nitschke, 2012). En forme planctonique, *S. aureus* deviendrait plus facilement détectable par le système immunitaire et plus facilement accessible aux différents antibiotiques (Davies and Marques, 2009) la rendant alors plus vulnérable (Figure II-14).

II.3.1.3. Compétition nutritionnelle

La disponibilité en nutriments est un des facteurs important pour la croissance des pathogènes lorsque des infections et des compétitions nutritionnelles ont lieu. Le fer est une ressource critique pour le métabolisme bactérien puisqu'il intervient comme cofacteur de très nombreuses enzymes. Il est généralement très limité dans les niches infectieuses où une immunité nutritionnelle est mise en place pour réduire la disponibilité de ce nutriment (Ward et al., 2011). Les bactéries possèdent différents facteurs pour récupérer le fer exogène par la production de sidérophores ou en capturant l'hème extracellulaire (Beasley et al., 2009; Grigg et al., 2007; Ochsner et al., 2000; Poole et al., 1991). La récupération directe des ions Fe^{2+} est un autre moyen de récupérer cet ion. Généralement présent en très petite quantité, les ions Fe^{2+} sont en plus grande concentration dans le mucus des patients CF (Hunter et al., 2013). *P. aeruginosa* produit des sidéropores (pyoverdine/pyocheline) pour récupérer les ions Fe^{2+} et le système Feo les transporte dans la bactérie. Un mécanisme similaire serait mis en place chez *S. aureus* avec les protéines FeoA et FeoB (Cartron et al., 2006). Dans un modèle de dialyse péritonéale de rat qui est normalement déplété en fer, le transcriptome de *P. aeruginosa* révèle qu'en présence de *S. aureus*, une sous-expression de tous les systèmes d'acquisition du fer est observée. Cette sous-expression est contradictoire avec un environnement pauvre en fer où une surexpression des systèmes d'acquisition du fer est normalement attendue. Dans ce modèle, le gène LasA et les phénazines sont aussi surexprimés. Les phénazines peuvent récupérer les ions Fe^{2+} libérés par la lyse de *S. aureus* médiée par LasA (Figure II-14) (Mashburn et al., 2005).

Bibliographie

II.3.1.4. Manipulation du système immunitaire

La phospholipase A2 de type II sécrétée (sPLA2-IIA) est une molécule produite par les cellules eucaryotes appartenant à la superfamille des enzymes ayant une activité d'hydrolyse des membranes phospholipidiques (Pernet et al., 2014). Elle participe à une variété de processus inflammatoire et à l'immunité anti-bactérienne (Pernet et al., 2014) notamment avec une activité bactéricide sur les bactéries à coloration de Gram positives. Chez les patients CF, la concentration de sPLA2-IIA dans le sputum de patients CF augmente avec l'âge et atteint un plateau vers 15-20ans, correspondant à l'âge de l'inversion de tendance de la présence de *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Pernet et al., 2014). A cet âge, une concentration de 40ng/mL est retrouvée, correspondant à la concentration minimale inhibitrice chez des souches cliniques CF de *S. aureus*. A l'aide de son T3SS, *P. aeruginosa* injecte la toxine ExoS dans la cellule hôte. En réponse, une activation du facteur de transcription cellulaire KLF-2 se produit qui augmente la transcription de sPLA2-IIA qui cible *S. aureus*. De plus, la présence de *S. aureus* augmente la transcription du T3SS de *P. aeruginosa* augmentant alors *in fine*, la production de cette phospholipase (Tognon et al., 2019). Par conséquent *S. aureus* est responsable de l'augmentation de la production de sPLA2-IIA provoquant sa lyse.

II.3.2. L'état de coexistence

II.3.2.1. Passage de la compétition à la coexistence

Le passage de l'état de compétition à l'état de coexistence reste énigmatique. Les données recueillies indiquent qu'une évolution des deux partenaires bactériens, de souches d'infections précoces antagonistes à des souches d'infections tardives coexistantes, se produit dans les poumons des patients CF (Michelsen et al., 2014, 2016). L'environnement pulmonaire ainsi que la composition en bactéries favoriserait l'évolution de ces souches vers la coexistence. Même si *S. aureus* évolue et s'adapte dans les poumons, l'état d'interaction semble être gouverné essentiellement par *P. aeruginosa* : une souche compétitrice restera antagoniste peu importe la souche de *S. aureus* testée (Baldan et al., 2014; Limoli et al., 2017; Michelsen et al., 2014). Cette partie présentera les différentes évolutions de nos bactéries d'intérêt pouvant conduire à la coexistence ainsi que les facteurs de l'hôte pouvant aider à cette transition.

Bibliographie

II.3.2.2. Evolution de *Staphylococcus aureus*

L'analyse transcriptomique (RNA-seq et RT-qPCR) d'une paire isogénique de *S. aureus* d'infections précoces et tardives, montre une surexpression des gènes *spa*, *sak*, *aur* et *sodM* dans les souches d'infections tardives (Treffon et al., 2018; Windmüller et al., 2015). Le gène *spa* code pour la protéine A (Spa) dont le rôle est de se lier au fragment Fc des IgG bloquant la reconnaissance au Fc récepteur présent à la surface de cellules phagocytaires professionnelles et d'inhiber la voie classique du complément (Windmüller et al., 2015). Les gènes *sak* et *aur* codent respectivement pour la staphylokinase et l'auréolysine. Leur fonction est de faciliter la diffusion de *S. aureus* dans la matrice extracellulaire en détruisant les protéines la composant et participe à l'évasion du système immunitaire en inactivant les peptides anti-microbiens et la protéine C3 du complément (Bokarewa et al., 2006; Laarman et al., 2011). Le gène *sodM* code pour une superoxyde dismutase secondaire détoxifiant les espèces réactives de l'oxygène (Treffon et al., 2018) et participant à la protection face à la calprotectine, peptides chélatant les ions Fe²⁺ (Garcia et al., 2017). Les poumons CF sont caractérisés par leur recrutement massif de neutrophiles (Conese et al., 2003) qui augmentent le stress oxydatif médié par les ROS (cf II.1.2.6). La surexpression de SodM permettrait de résister à l'infiltration massive de ces neutrophiles.

Des délétions de 5pb au niveau de la région intergénique *icaR/icaA* de l'opéron *ica* apparaissent chez les souches de *S. aureus* (Schwartbeck et al., 2016). Cette délétion conduit à la surproduction d'adhésine polysaccharidique, responsable du phénotype mucoïde de *S. aureus*. Ce phénotype mucoïde apporte plusieurs avantages à la bactérie notamment la croissance dans un milieu pauvre en nutiment (comme le mucus des patients CF) et une meilleure résistance à l'opsonophagocytose (Schwartbeck et al., 2016). Ainsi par l'apparition de mutation dans la région intergénique de *ica* et ces dysrégulations dans l'expression des facteurs *spa*, *sak*, *aur* et *sodM*, les souches tardives de *S. aureus* semblent donc plus à même à échapper au système immunitaire et à résister davantage au milieu pulmonaire mucoviscidosique.

En plus de l'environnement pulmonaire, *S. aureus* doit se défendre face aux agressions menées par *P. aeruginosa*, et l'un de ces mécanismes est l'apparition de SCVs. Ces SCVs résistent à l'action du HQNO car possédant un mode de respiration fermentaire, l'inhibition du cytochrome n'a plus d'effet. Les SCVs possèdent un phénotype de croissance ralenti comparé à des souches sauvages. Le mode fermentaire

Bibliographie

ainsi que cette croissance ralentie permettent à *S. aureus* d'augmenter sa résistance à la vancomycine, à l'oxacilline et plus généralement, aux antibiotiques dont la cible est la paroi bactérienne (Orazi and O'Toole, 2017). De plus, une surexpression de *sigB*, *sarA* et une répression de *agr* sont observées chez les SCVs. La conséquence majeure est une augmentation de la production du biofilm, des protéines des surfaces telles que des adhésines et une diminution des facteurs de virulence (Mitchell et al., 2010). L'environnement pulmonaire ainsi que la présence de *P. aeruginosa* permettent à *S. aureus* de s'adapter à l'environnement mucoviscidose hostile. La diminution de la production de ces facteurs de virulence, l'augmentation de l'expression des facteurs d'échappement au système immunitaire et le passage en mode SCV favorisent la persistance de *S. aureus* dans les poumons.

II.3.2.3. Evolution de *Pseudomonas aeruginosa*

La comparaison de données de séquençages et/ou d'analyses transcriptomiques de souches de *P. aeruginosa* d'infections précoces et d'infections tardives montrent des mutations dans les quorums sensing de *P. aeruginosa las/rhl*. Ces mutations inactivent les régulateurs *lasR* et *RhlR* diminuant la production des facteurs de virulence telles que *LasA*, les phénazines et HQNO (Michelsen et al., 2014; Yang et al., 2011a). De plus, une expérience de co-évolution *in vitro* en coculture avec *S. aureus* réalisés sur 21j a montré une sous-expression des gènes *lasR/rhlR* et des facteurs de virulence associés (*lasA*, *lasB*, *rhlA*, *rhlB*) (Zhao et al., 2018). L'environnement pulmonaire ainsi que la présence de *S. aureus* seraient des pressions de sélection nécessaires à la diminution de la virulence de *P. aeruginosa* par inactivation de ses quorum-sensing.

Un des gènes les plus fréquemment mutés dans les souches d'infections tardives est *mexZ*, répresseur transcriptionnel des gènes *MexXY*. Ces gènes codent pour des composants de la pompe à efflux multi-drogues *MexXY-OprM*. L'inactivation de *mexZ* permet de surexprimer cette pompe multi-drogue. Les patients CF sont souvent traités par antibiotiques comme la tobramycine. Ces traitements peuvent sélectionner des mutations dans les pompes à efflux et leur régulateurs (Smith et al., 2006)

Des mutations dans le gène *muca* sont souvent retrouvés dans les souches d'infections tardives (Limoli et al., 2017; Yang et al., 2011b). Ce gène est un facteur anti-

Bibliographie

sigma dont le but est de séquestrer le facteur σ^{22} . L'inactivation de *mucA* permet de libérer σ^{22} et d'activer l'expression de l'opéron de biosynthèse d'alginate (*algT/algD*), polysaccharide sécrété et responsable du phénotype mucoïde chez *P. aeruginosa*. De plus, en analysant le transcriptome de souches $\Delta mucA$, une down-régulation des rhamnolipides, des sidérophores (pyoverdine et pyocheline) et de HQNO, facteurs antistaphylococciques, est retrouvée. (Limoli et al., 2017). Ces phénotypes sont reproductibles. En utilisant la souche de référence PAO1 non-mucoïde et compétitrice avec *S. aureus*, l'acquisition de mutations dans *mucA* apporte la mucoïdie et sa compétition avec *S. aureus* est réduite (Limoli et al., 2017).

II.3.2.4. Rôle de l'hôte

Peu de données sont disponibles quant au rôle direct de l'hôte dans l'évolution des souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Néanmoins, une protéine a montré une fonction intéressante qui dirigerait le comportement de nos deux bactéries. La calprotectine est une protéine du système immunitaire innée ayant une fonction antibactérienne par séquestration des ions métalliques au sein des niches infectieuses et participe donc à l'immunité nutritionnelle. Des expositions de cultures de *P. aeruginosa* à la calprotectine montre une diminution de l'expression de facteurs anti-staphylococcique (HQNO) (Wakeman et al., 2016). En rajoutant cette protéine en coculture planctonique, le nombre de *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa* est fortement augmenté. Ces résultats sont reproductibles dans un modèle *in vivo* de co-infection pulmonaire chez la souris (Wakeman et al., 2016). De plus, les souches d'infections tardives de *S. aureus* (cf II.3.2.2) montrent une meilleure résistance à la calprotectine, par l'intermédiaire de la surexpression de *sodM*. Cette adaptation montre que *S. aureus* s'adapte à la présence de calprotectine qui favorise la coexistence en diminuant la production des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

La diminution de la production des facteurs de virulence chez nos deux bactéries d'intérêt indiquent une adaptation à l'environnement pulmonaire et à leurs congénères bactériens. L'évolution de *S. aureus* et *P. aeruginosa* conduit à l'apparition, dans le modèle actuel, de la coexistence.

Bibliographie

II.3.2.5. La coexistence entre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Après avoir évolué dans les poumons, les souches dites « tardives » de *P. aeruginosa* ne sont plus virulentes vis-à-vis de *S. aureus*. La notion de souche tardive est mal définie dans la littérature. D'après l'équipe de Baldan R, la durée de colonisation définit la notion de souches tardives (4,5 à 13ans après une primo-colonisation) (Baldan et al., 2014). La coexistence, terme donné pour caractériser une absence de compétition, s'établit et l'impact de cette interaction entre nos deux pathogènes n'a été que peu décrit. Cependant quelques données semblent indiquer que la coexistence bactérienne pourrait être bénéfique aux deux protagonistes.

Dans un autre contexte de co-infection, *S. aureus* et *P. aeruginosa* coexistent, indépendamment du statut précoce ou tardif de la souche (Alves et al., 2018; DeLeon et al., 2014; Pastar et al., 2013). Lors de cocultures réalisées avec *P. aeruginosa* dans un modèle de plaie *in vitro*, la tolérance de *S. aureus* à la gentamicine et à la tétracycline est augmentée (DeLeon et al., 2014). Le mécanisme sous-jacent lié à cette augmentation n'est pas connu mais la délétion des gènes chez *S. aureus* et *P. aeruginosa* impliqués dans la formation du biofilm (respectivement *ica* et *alg*) annule ce phénotype (DeLeon et al., 2014). De plus, lors d'une co-infection de kératocytes humain, l'adhésion de *P. aeruginosa* est améliorée ainsi que le nombre de *S. aureus* internalisés (Alves et al., 2018). Du point de vue de l'hôte eucaryote, la co-infection diminue l'expression du facteur KGF1 conduisant à un retard de l'épithélialisation (la vitesse de cicatrisation). Ensemble, ces données montrent que lors d'une co-infection *S. aureus/P. aeruginosa* en coexistence, les deux bactéries sont capables de montrer un effet synergique délétère pour l'hôte.

De retour dans le modèle de la mucoviscidose, Michelsen *et al.*, ont étudié l'interaction entre une souche adaptée coexistente de *P. aeruginosa* (DK2-P2M24-2003) issue d'un patient CF avec une souche de laboratoire de *S. aureus* JE2 (Michelsen et al., 2016). En présence de JE2, la morphologie de la colonie de DK2 est plus épaisse, sans pigment comparé à la souche compétitrice PAO1. Cette morphologie particulière a été attribuée à une augmentation de la densité de *P. aeruginosa* ainsi qu'à une diminution de sa mortalité (autolyse) (Michelsen et al., 2014). En utilisant une banque de mutants construite dans la souche DK2, le mutant *pqsB* (quorum-sensing PQS) montre une absence de ces phénotypes en coculture avec JE2. Avec une

Bibliographie

utilisation cette fois-ci d'une banque de mutants chez *S. aureus* (banque Nebraska), le mutant *agrC* (gène du quorum-sensing *agr*) n'est plus capable d'induire l'augmentation de la densité de *P. aeruginosa* et la diminution de son auto-lyse. Ces résultats indiquent qu'en coexistence, *P. aeruginosa* diminue son auto-lyse et améliore sa croissance en présence de *S. aureus*. Ces phénotypes sont dépendants des quorum-sensing de nos bactéries. Une comparaison de métabolites issus de *P. aeruginosa* DK2 (coexistant) et PAO1 (compétiteur) en présence de *S. aureus* a été conduite. Les résultats du MALDI-TOF-IMS montrent que, tandis que pour la souche PAO1, une production de pyocyanine, rhamnolipides, HQNO et PQS, facteurs de virulence connus lysant *S. aureus*, est observée, une absence de production de ces facteurs et une augmentation de la synthèse de HHQ (2-heptyl-4-hydroxyquinoline) sont constatées. Cette molécule est relarguée dans le surnageant de *P. aeruginosa* et permet à *S. aureus* d'augmenter sa résistance à la tobramycine (Michelsen et al., 2016). Ainsi, en coexistence la production spécifique de ce métabolite octroie un effet bénéfique à *S. aureus*. Le mécanisme sous-jacent amenant à cette surproduction a été étudié. HHQ est un métabolite intermédiaire du quorum-sensing PQS. Il est normalement métabolisé à partir de tryptophane par l'opéron *pqsABCD* et est transformé en PQS, molécule signale finale, par l'intermédiaire de la protéine PqsH. Une expérience de bioluminescence à l'aide du promoteur *pqsH* cloné en amont du gène *lux* indique une activation de ce promoteur beaucoup plus faible dans la souche coexistente DK2 comparée à la souche PAO1 (Michelsen et al., 2016). Dans le même principe, le promoteur du gène *pqsA*, responsable de la synthèse de HHQ, est davantage activé dans la souche DK2 que dans la souche PAO1. Une accumulation de HHQ est donc observée dans cette souche de coexistence par augmentation de sa synthèse et diminution de sa dégradation. De façon intéressante, DK2 en coculture avec le mutant *S. aureus* dans le gène *agrC* possède une production de HHQ réduite comparé à une coculture avec une souche JE2 sauvage. Ces résultats indiquent que la production de HHQ est dépendante du quorum-sensing de *S. aureus*.

Le peu de données disponibles à ce jour révèle qu'en dehors de la mucoviscidose, des interactions bénéfiques non antagonistiques existent et conduisent à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques ainsi qu'à une adhésion et internalisation augmentées pour *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Dans le contexte mucoviscidosique la coexistence permet d'améliorer la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* ainsi qu'une amélioration de la croissance de *P. aeruginosa*. Une implication

Bibliographie

des quorums-sensing de nos deux bactéries suggère une communication interbactérienne lors de la coexistence.

II.4.Objectifs de la thèse

Dans le modèle actuel, les souches tardives de *P. aeruginosa* coexisteraient avec *S. aureus*. L'adaptation à l'arbre respiratoire mucoviscidosique et aux partenaires bactériens conduit à une abolition de la production de facteurs de virulence majeurs dépendant du quorum-sensing de *P. aeruginosa*. Néanmoins, nous ne savons que peu de choses sur l'impact réel que *P. aeruginosa* possède sur *S. aureus* dans ce contexte de coexistence. Quelques études nous suggèrent que *P. aeruginosa* pourrait modifier la sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus* et la coexistence pourrait impacter plus sévèrement la santé des patients (Alves et al., 2018; DeLeon et al., 2014; Michelsen et al., 2016). Dans notre contexte, les études cliniques nous dévoilent des résultats contradictoires quant à l'impact de la co-infection par *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur l'état de santé des patients et ne prennent pas en compte le statut d'interaction entre les deux agents pathogènes.

Mon travail de thèse s'inscrit dans cet objectif de caractérisation de l'état de coexistence entre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Dans un premier axe, une approche transcriptomique sans a priori utilisant des souches cliniques en coexistence issues de patients CF a été effectuée pour décrypter moléculairement l'impact de *P. aeruginosa* sur *S. aureus*. Ce travail constitue la partie 1 des résultats expérimentaux et a fait l'objet d'une publication dans Scientific Reports.

Dans un second axe et en collaboration avec Anne Doléans-Jordheim de l'Institut des Agents Infectieux (IAI - Lyon), une étude rétrospective sur un an a été conduite sur les données cliniques et microbiologiques des patients CF de la cohorte lyonnaise pour étudier l'impact de la co-infection et de l'état d'interaction *entre S. aureus* et *P. aeruginosa* sur l'état de santé des patients CF. Ce travail présenté dans la partie 2 fait objet d'un article soumis dans European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

Toujours dans le but d'approfondir nos connaissances sur cet état d'interaction, une approche par TN-seq a été adoptée pour caractériser les gènes essentiels de *S. aureus* nécessaires à la coexistence avec *P. aeruginosa*. Les données de Michelsen suggèrent un potentiel rôle du quorum-sensing dans la coexistence (Michelsen et al.,

2016). Une utilisation de banques saturées de mutants nous permet de confirmer ces résultats et d'identifier de nouveaux gènes essentiels.

Enfin, l'analyse des données de RNA-seq de la partie 1 a révélé 1 gène inconnu potentiellement impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. La caractérisation de ce nouveau gène est primordiale pour acquérir de nouvelles connaissances dans la lutte contre l'antibiorésistance bactérienne. La dernière partie de ma thèse a été de décrire et de caractériser ce gène et fait l'objet d'un short article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

III. Résultats expérimentaux

**La coexistence avec *Pseudomonas aeruginosa*
modifie le transcriptome de *Staphylococcus aureus*,
son antibiorésistance et son internalisation dans les
cellules épithéliales**

**Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus*
transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells**

Published in Scientific Reports 11/11/2019

Paul Briaud, Laura Camus, Sylvère Bastien, Anne Doléans-Jordheim, François

Vandenesch and Karen Moreau

Résultats expérimentaux

Introduction

Afin d'évaluer l'impact de *P. aeruginosa* sur *S. aureus*, nous avons décidé de choisir une approche transcriptomique par RNA-seq. A l'aide des Hospices Civils de Lyon (HCL), nous avons pu collecter les souches SA et PA issues de co-infection pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Les paires de souche, *S. aureus* et *P. aeruginosa* provenant du même patient co-infecté, ont été évaluées par un test de compétition sur gélose afin de définir leur phénotype d'interaction. Environ 60% des paires testées (50) présentent un phénotype de coexistence. Deux paires en coexistence et deux paires en compétition ont été cultivées et un séquençage total des ARNs (RNA-seq) a été réalisé. Les listes des transcrits différemment exprimés ont été dressées en comparant les monocultures de *S. aureus* aux cocultures de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Deux profils transcriptomiques différents apparaissent entre les 2 états d'interaction. Nous confirmons ce qui a déjà été montré en compétition avec une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la respiration oxydative et une surexpression des gènes nécessaires à la voie fermentaire (Filkins et al., 2015; Tognon et al., 2017). Pour la coexistence, de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus* se retrouvent surexprimés ainsi que de nombreux gènes codant pour des transporteurs. Des RT-qPCR sur 12 paires issues de 12 patients différents ont confirmé la surexpression des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques *tet38*, *norA* et *norC*. L'exposition en coculture de *S. aureus* à la tétracycline et à la ciprofloxacine, antibiotiques exportés par ces pompes, montre une amélioration de sa survie. De plus, une augmentation de l'internalisation en cellules épithéliales pulmonaires A549 en coculture suggère une amélioration de la persistance de *S. aureus*, en lien possible avec la surexpression de *tet38*. L'augmentation de l'expression de ces pompes n'est possible uniquement lorsqu'un contact rapproché est permis entre les deux bactéries, comme le montre l'expérience de transwell et l'exposition du surnageant de *P. aeruginosa* sur des cultures de *S. aureus*. Enfin la voie de signalisation chez *S. aureus* par laquelle ces surexpressions sont permises fait intervenir le régulateur majeur MgrA.

Ces résultats montrent qu'en coexistence, *S. aureus* possède une signature transcriptomique différente de l'état de compétition avec une amélioration de sa résistance aux antibiotiques et de sa persistance en cellules épithéliales pulmonaires. Ainsi, *S. aureus* possède un avantage à être en coexistence avec *P. aeruginosa*, lui permettant potentiellement d'améliorer la survie dans les poumons face au système

Résultats expérimentaux

immunitaire et face aux traitements antibiotiques. Ainsi, la coexistence entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* pourrait favoriser la persistance de l'infection et impacter l'état de santé des patients.

OPEN

Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells

Paul Briaud¹, Laura Camus¹, Sylvère Bastien¹, Anne Doléans-Jordheim^{3,4}, François Vandenesch^{1,2,3} & Karen Moreau^{1*}

Cystic fibrosis (CF) is the most common life-threatening genetic disease among Caucasians. CF patients suffer from chronic lung infections due to the presence of thick mucus, caused by *cftr* gene dysfunction. The two most commonly found bacteria in the mucus of CF patients are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. It is well known that early-infecting *P. aeruginosa* strains produce anti-staphylococcal compounds and inhibit *S. aureus* growth. More recently, it has been shown that late-infecting *P. aeruginosa* strains develop commensal-like/coexistence interaction with *S. aureus*. The aim of this study was to decipher the impact of *P. aeruginosa* strains on *S. aureus*. RNA sequencing analysis showed 77 genes were specifically dysregulated in the context of competition and 140 genes in the context of coexistence in the presence of *P. aeruginosa*. In coexistence, genes encoding virulence factors and proteins involved in carbohydrates, lipids, nucleotides and amino acids metabolism were downregulated. On the contrary, several transporter family encoding genes were upregulated. In particular, several antibiotic pumps belonging to the Nor family were upregulated: *tet38*, *norA* and *norC*, leading to an increase in antibiotic resistance of *S. aureus* when exposed to tetracycline and ciprofloxacin and an enhanced internalization rate within epithelial pulmonary cells. This study shows that coexistence with *P. aeruginosa* affects the *S. aureus* transcriptome and virulence.

Most microorganisms are frequently embedded within communities of mixed species where different microbial interactions can occur between individual species. In the case of infection, these interactions between species can influence pathogenic behavior such as virulence, biofilm formation and antibiotic tolerance^{1–4}.

One of the most well-known examples of pathologies in which many bacterial interactions are described are lung diseases occurring during Cystic Fibrosis (CF). The airways of CF patients are colonized by multiple microorganisms whose prevalence varies with the age of the patients. Among them, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the most prevalent pathogens and are acquired in subsequent order. The typical pattern of chronic infection establishment begins with the early acquisition of *S. aureus*, (60% prevalence among children aged <2 years and the highest prevalence in children of 11–17 years (80%)), while prevalence slowly declines in adults (50%)⁵. In contrast, infections by *P. aeruginosa* occur later with the highest prevalence in adults (70% among 35–44 year-old patients). Although these bacteria seem to succeed one another, they are not mutually exclusive since patients are frequently diagnosed as being co-infected by *S. aureus* and *P. aeruginosa* (from 35% to 50%)^{6,7}.

While *P. aeruginosa* is recognized as the leading cause of lung function decline, the significance of *S. aureus* in the course of CF disease is still being debated. It has been shown that one of the risk factors for initial *P. aeruginosa*

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Université Lyon1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR5308, Lyon, France. ²Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ³Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁴Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1 & VetAgro Sup, Villeurbanne, France. *email: karen.moreau@univ-lyon1.fr

airway infection includes *S. aureus* pre-colonization^{8–10}. However, the impact of coinfection by the two pathogens on the evolution of the disease remains unclear^{11–13}.

S. aureus and *P. aeruginosa* have been identified in the same lobe of CF lungs^{14,15}, suggesting that both pathogens are present in the same niche and can in fact interact *in vivo*. Interactions have been widely studied and it is commonly admitted that *P. aeruginosa* outcompetes *S. aureus*. Different mechanisms have been described¹⁶; for example, *P. aeruginosa* secreted products can inhibit the growth or lyse *S. aureus* as well as induce epithelial cells to kill *S. aureus* and other Gram-positive bacteria^{8,17,18}.

However, these interactions can evolve during chronic colonization. Indeed, *P. aeruginosa* strains isolated from early infection outcompete *S. aureus*, as previously described, while strains isolated from chronic infection are less aggressive and can be co-cultivated with *S. aureus*^{19,20}. Furthermore, *P. aeruginosa* isolates from mono-infected patients are more competitive towards *S. aureus* than isolates from coinfecting patients²¹.

In contrast to antagonistic interactions, nothing is known about the effects of *P. aeruginosa* and *S. aureus* interactions in this context of coexisting bacteria within the same infectious niche. Using a transcriptomic approach, we analyzed how co-cultivation with non-competitive *P. aeruginosa* altered *S. aureus* gene expression, especially genes encoding Nor family efflux pumps. In the presence of *P. aeruginosa*, over-expression of these genes increased *S. aureus* antibiotic tolerance and the rate of internalization into epithelial cells, two key determinants of chronic infection.

Results

Coexistence interaction involves more than half of the *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolates from co-infected CF patients.

Two types of interactions between *S. aureus* and *P. aeruginosa* could be observed with CF patient isolates: the well-described competitive phenotype, where *P. aeruginosa* inhibits *S. aureus* growth¹⁶, and the newly described phenotype of coexistence, where *P. aeruginosa* is unable to outcompete *S. aureus*^{19–21}. In order to quantify the importance of this last phenotype, we collected 50 pairs of *S. aureus* and *P. aeruginosa* from 36 co-infected CF patients. The interaction between the two pathogens was analyzed by a competitive test on trypticase soy agar (TSA) plates (Table 1 - Fig. 1A). We observed that 61% of strain pairs presented a coexistence phenotype whereas 39% were in competitive interaction. To determine whether the pairs of coexisting strains and competitive strains were phenotypically different, we measured colony size, analyzed the hemolytic properties of each strain, and searched for pigmentation and mucoid phenotype for all *P. aeruginosa* strains. No significant differences were observed between coexisting and competitive strains with respect to pigment production, mucoid phenotype and hemolysis (Fig. S1). We observed a significant difference in the size of *S. aureus* colonies in which those of coexisting strains were larger than those of competition strains after 24 h of TSA plate culture. The significance of such a difference and its impact on interaction with *P. aeruginosa* remain to be explored. As others have already described that early infectious strains of *P. aeruginosa* are more aggressive for *S. aureus* than the late infectious strains^{19,20}, we wondered if the type of interaction could be related to the duration of colonization. To answer this question, we determined the duration of co-colonization of *S. aureus* and *P. aeruginosa* for each patient. The average duration of colonization for coexisting strains was 744.8 ± 97.64 days and for competing strains 941.2 ± 137 days. The difference was statistically non-significant (Fig. S1).

Planktonic cultures were conducted on two pairs of strains: one competitive pair (SA2597/PA2596) and one coexisting pair (SA2599/PA2600). In both cases, we observed that *P. aeruginosa* growth was not altered by *S. aureus*. On the other hand, in the case of the competitive pair, *P. aeruginosa* had a negative effect on *S. aureus* growth after 4 hours of coculture (Fig. 1B).

Agar plate competition assays mixing respectively PA2600 (from coexisting pair) and PA2596 (from competitive pair) with both SA2597 and SA2599 were performed (Fig. 1A). PA2596 outcompeted both SA strains whereas PA2600 was unable to inhibit any of the *S. aureus* strains, suggesting that the interaction phenotype is dependent on the *P. aeruginosa* strains. These results were confirmed with other combinations of strains (Fig. S2).

P. aeruginosa differentially dysregulates *S. aureus* transcriptome according to coexistence/competition.

To obtain an overview of the impact of *P. aeruginosa* on the expression of *S. aureus* genes, a comparative transcriptomic study was conducted between SA2597 and SA2599 in monocultures, and the same strains in coculture with a competition PA strain (PA2596) and a coexisting PA strain (PA2600). Thus, for each interaction state, we tested two pairs of strains, namely SA2597/PA2596 and SA2599/PA2596 for the competition and the SA2597/PA2600 and SA2599/PA2600 pairs for coexistence. Gene expression was considered dysregulated when dysregulation was common to both pairs of strains. Therefore, seventy-seven *S. aureus* genes were specifically dysregulated in the context of competition and 140 genes in the context of coexistence while only 16 genes were dysregulated both in competition and in co-existence (Table S4).

KEGG analyses were performed on dysregulated genes to associate each gene with a functional class (Fig. 2). In competition state, the main dysregulated class of genes belongs to genetic information and processing, with an increase of tRNA and ribosomal RNA (Fig. 2A). We also observed the dysregulation of genes involved in major metabolism pathways of carbohydrates and amino acids. The down-regulation of the Acetyl-coenzyme A synthetase encoding gene (*acsA*) was noted. Other genes involved in energetic metabolism were up-regulated in the presence of *P. aeruginosa*, especially dehydrogenase enzymes such as the lactate dehydrogenase (*ldhA*), the alanine dehydrogenase (*ald1*), the glutamate dehydrogenase (*gluD*), the 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (*rocA*), the 2-oxoglutarate dehydrogenase (*odhA*) and the aldehyde-alcohol dehydrogenase (*adhE*). The upregulation of the *ldh* gene is consistent with the up regulation of the L-lactate permease (*lctP*) encoding gene. All these factors, as well as acetyl-coA, are involved in energetic metabolism and redox reactions conducted to feed the Krebs cycle and ensure the production of ATP.

In the context of coexistence, although *P. aeruginosa* does not appear to impact major metabolic pathways of *S. aureus* as it does not alter growth, the expression of 140 *S. aureus* genes was affected by the presence of *P.*

Patients	<i>S. aureus</i>					<i>P. aeruginosa</i>					co-colonisation length (days)	type of interaction
	strain number	hemolyse type	Colony size (mm)	pigmentation	MLST	strain number	hemolyse type	Colony size (mm)	pigmentation	mucoidy		
1	SA2597	γ	1	none		PA2596	β	4	Yellow	yes	1544	competition
2	SA2599	β	3	none	CC188	PA2600	γ	5	Yellow	yes	1902	coexistence
3	SA27	β	2	none	CC398	PA27	γ	3	none	no	295	coexistence
4	SA30	β	2	none	CC188	PA30	γ	1,2	none	no	133	coexistence
5	SA31	β	3	none	CC15	PA31	γ	1,1	none	yes	921	coexistence
6	SA42	γ	2	none	CC30	PA42	γ	20	Yellow	yes	?	coexistence
7	SA69	β	3	none	CC25	PA69	β	2,1	none	yes	92	coexistence
8	SA80	β	2	none	CC15	PA80A	α	2,2	Green	yes	623	coexistence
				none		PA80B	α	6	none	yes	623	coexistence
9	SA82	β	4	none	CC45	PA82	γ	4	none	yes	?	coexistence
10	SA146	γ	2	none	CC88	PA146	γ	4,5	Green	yes	928	coexistence
11	SA147	β	2	none		PA147A	γ	2	Green	no	?	competition
				none		PA147B	γ	1,4	none	no		competition
12	SA148	γ	1 à 2	none		PA148A	β	7	none	yes	839	competition
				none		PA148B	β	14	Green	yes		coexistence
13	SA150	β	2	none		PA150	γ	1	none	no	380	coexistence
14	SA151	β	2	none		PA151A	α	4,5	Brown	yes	538	coexistence
				none		PA151B	β	4	Yellow	yes		coexistence
15	SA152	β	3	none	CC8	PA152	γ	13	none	yes	991	coexistence
16	SA153	β	3	none	CC398	PA153A	β	3	none	no	967	coexistence
						PA153B	β	2,5	Green	yes		coexistence
17	SA154	γ	2	none		PA154A	γ	35	none	yes	595	coexistence
				none		PA154B	γ	5	Green	yes		coexistence
18	SA155	β	2	none		PA155	α	11	Green	yes	1256	competition
19	SA156	β	2	none	CC398	PA156	α	2,1	none	yes	49	coexistence
20	SA157	β	2	none		PA157	β	5	Green	yes	?	competition
21	SA158	γ	1 à 2	none		PA158	β	6	Green	yes	?	competition
22	SA159	β	<1 SCV (1,5)*	none		PA159A	β	5	none	yes	1353	competition
				none		PA159B	β	18	Green	yes		competition
23	SA160	γ	<1 SCV (1,1)*	none		PA160A	β	5	Green	yes	1332	competition
				none		PA160B	β	10	Yellow	yes		competition
24	SA161	β	2	none		PA161	α	2	none	no	1043	coexistence
25	SA165	β	3	none		PA165A	β	3,9	none	yes	343	coexistence
				none		PA165B	β	4,1	none	yes		coexistence
26	SA166	γ	2	none		PA166A	α	4	Green	yes	1355	coexistence
				none		PA166B	α	4,5	Green	yes		coexistence
27	SA167	β	3	none		PA167	α	13	Green	yes	938	competition
28	SA168A	β	2	none		PA168	γ	4	none	yes	294	competition
	SA168B	β	2	none								competition
29	SA169	β	4	none		PA169	γ	3,5	none	no	904	coexistence
30	SA171	β	1 à 2	none		PA171	β	1,1	none	yes	601	coexistence
31	SA177	β	3	none		PA177	γ	2	none	yes	1380	coexistence
32	SA178	β	3	none		PA178	β	2,5	none	yes	519	coexistence
33	SA179	β	1 à 2	none		PA179	β	3	none	yes	91	competition
34	SA181	β	4	none		PA181	β	6	none	yes	1096	competition
35	SA182	γ	2	none		PA182A	β	5	Yellow	yes	987	competition
				none		PA182B	α	7	none	yes		competition
				none		PA182C	β	4,2	none	yes		coexistence
36	SA186	β	2	none		PA186	β	3	none	yes	623	competition

Table 1. *S. aureus* and *P. aeruginosa* clinical strains used in this study. 50 couples of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were collected from 36 patient sputum samples. Some patients presented several *P. aeruginosa* isolates, and one patient presented two *S. aureus* isolates. Colony size, pigmentation and mucoid phenotype were determined on TSA. Hemolysis type was determined on COS. Interaction type was determined by agar plate competition assay as described in the materials and methods section. The isolates in bold correspond to those used for the RNAseq and RT-qPCR analyses. MLST type were determined only for these isolates. *Colony size after 48 h incubation - ? colonization time before sampling could not be determined for these patients.

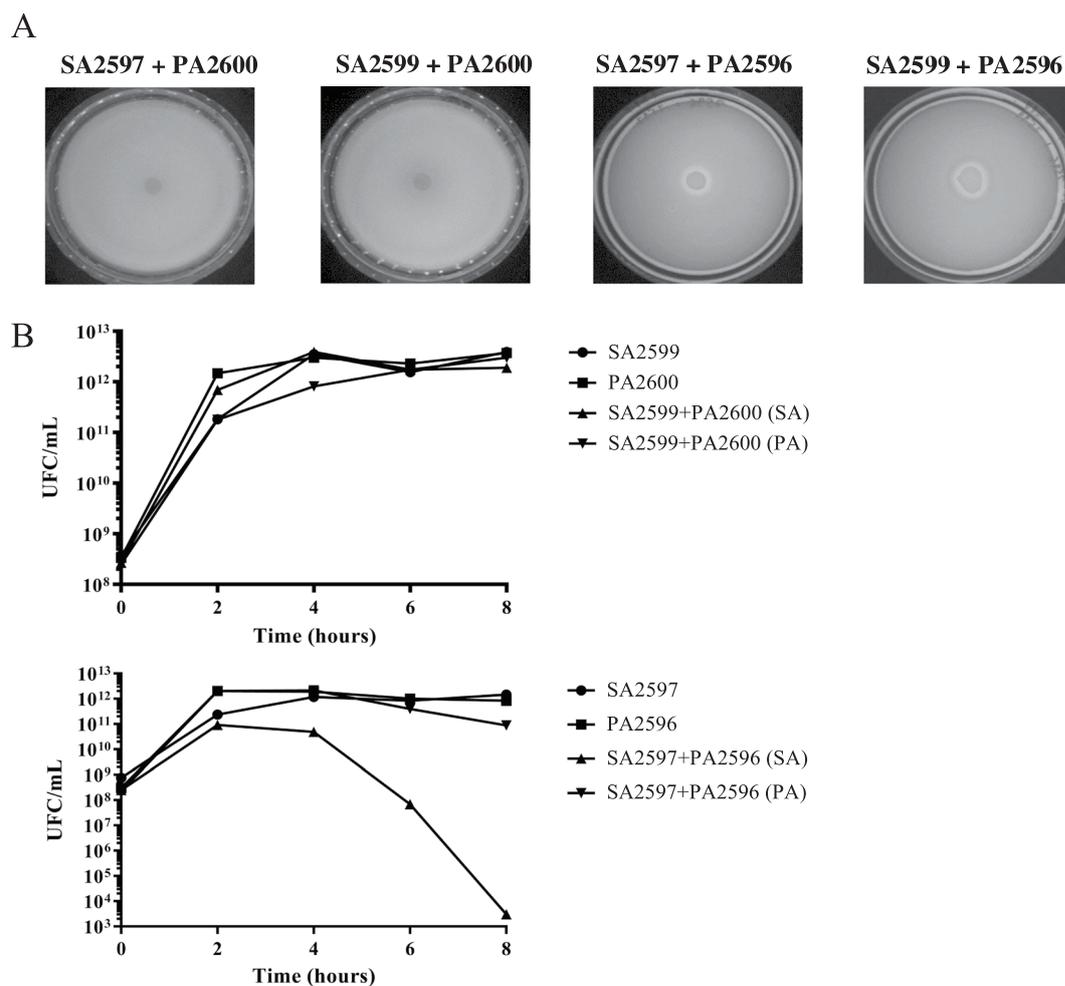


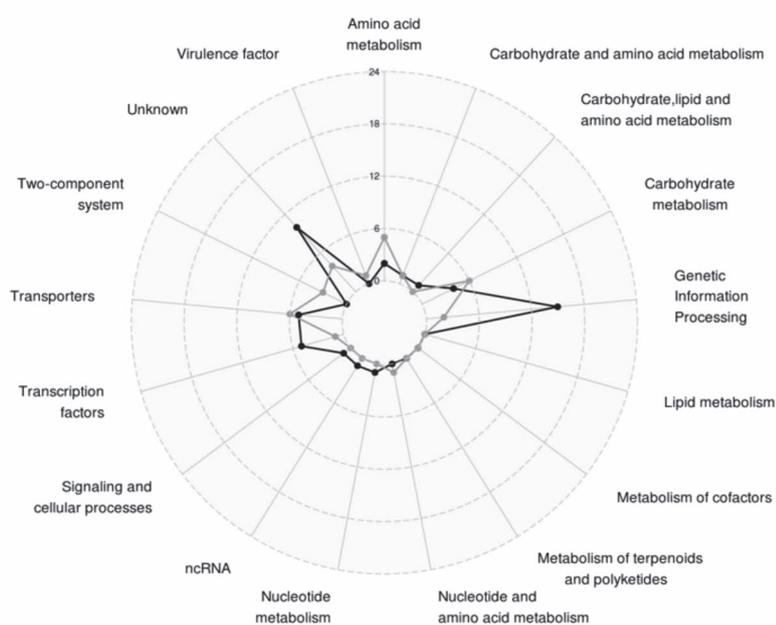
Figure 1. Competition assay between *S. aureus* and *P. aeruginosa*. **(A)** Competition test on agar plate. *S. aureus* and *P. aeruginosa* were grown on BHI for 8 hours at 37 °C. A layer of *S. aureus* was added on a TSA. After drying, a drop of *P. aeruginosa* was spotted. The inhibition halo indicates a competition state (SA2597 + PA2596 and SA2599 + PA2596). **(B)** Competition assay in planktonic culture. *S. aureus* and *P. aeruginosa* were mono-cultivated and co-cultivated for 8 hours. Every two hours, bacteria were plated on mannitol salt agar (MSA) and cetrimide to count *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. The results show one representative experiment from a triplicate. Upper panels, pairs in coexistence. Lower panels, pairs in competition.

aeruginosa (Fig. 2B). Nine known and predicted virulence factor encoding genes were upregulated, including alpha-hemolysin (*hla*), staphylokinase (*sak*), aureolysin (*aur*), the immunoglobulin-binding protein (*sbi*) and staphylococcal complement inhibitor (*scn*) genes. We also observed the overexpression of *saeRS* genes, coding a two component system that has been described as playing a major role in controlling the production of virulence factors such as those mentioned above²².

Other genes whose expression was affected by the presence of *P. aeruginosa* in a coexistence situation are involved in carbohydrates, lipids, nucleotides and amino acids metabolism. Most of them were down-regulated as several genes (*pgi*, *fbp*, *fda*) involved in glycolysis and the pentose phosphate pathway. Moreover, two operons (*nrdE*, *nrdI*, *nrdF* and *nrdG*, *nrdD*) belonging to ribonucleotide reductase (RNR) systems and converting nucleoside phosphate into deoxynucleotide phosphate, were both down-regulated (Table S4). RNRs are involved in the *de novo* production of deoxyribonucleotide di- or triphosphates, an essential process for the biosynthesis of DNA and its repair. They catalyze the limiting step of the synthesis of deoxyribonucleotide phosphates and thus control cell concentration²³.

Finally, several genes belonging to a transporter family were also over-expressed (polyamines, methionine, iron uptake and antibiotic resistance) in the coexistence state. Notably, all genes from the polyamine operon were over-expressed (*potABCD*) including *potR*, the regulator of polyamine genes. Polyamines control the physiology of *S. aureus* by acting as regulators of several genes involved in metabolism, transport and virulence^{24,25}. In addition, the same pattern was observed for the *metQPN* operon involved in methionine transport and *sirA/B* and *sstA/BC* genes for iron uptake, which may also reflect nutrient competition in coculture. Finally, transporter *norb_3* predicted as belonging to the *nor* family was over-expressed. Pumps from this family export a

A - Competition



B - Coexistence

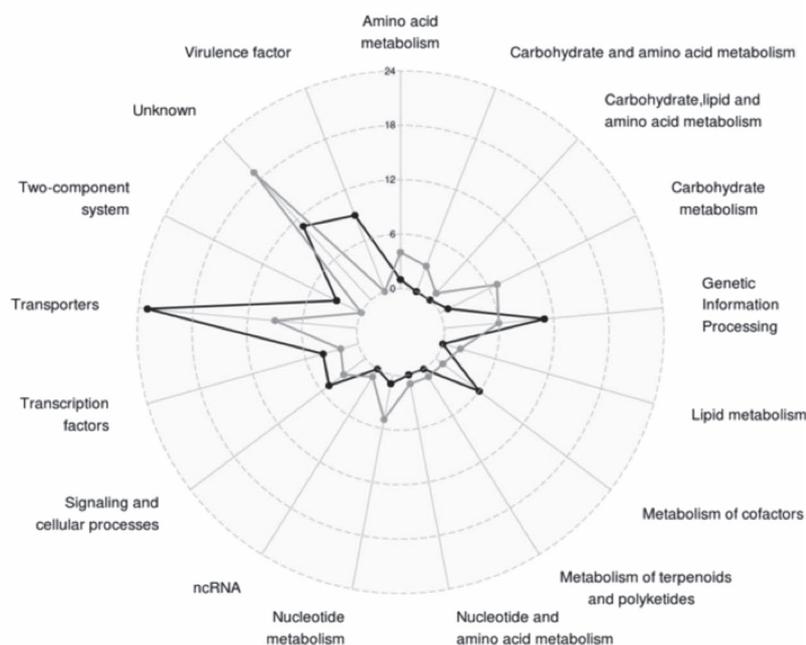


Figure 2. Number and functions of differentially expressed staphylococcal genes in the presence of *P. aeruginosa* when both species are: (A) in competition (SA2596 and SA2599 were co-cultivated with PA2597) or (B) in coexistence (SA2596 and SA2599 were co-cultivated with PA2600). RNAs were extracted at 4 hours and a RNAseq was performed in triplicates. KEGG mapper analysis was conducted on common significantly over-expressed (black) and under-expressed genes (grey) to address a functional classification. A gene was considered as differentially expressed when the fold change was strictly higher than 4 with $P_{adj} < 0.05$.

wide range of antibiotics such as erythromycin, tetracycline and quinolones. Indeed, *norB_3* corresponds to the well-described *tet38* gene involved in tetracycline resistance and internalization in pulmonary epithelial cells^{26,27}.

To confirm these results, we performed co-cultivations with 12 different co-existence *P. aeruginosa*-*S. aureus* strain pairs from CF patients. The 12 strain pairs came from 12 different patients and presented phenotypic diversity. *S. aureus* isolates belong to 8 different multilocus sequence typing (MLST) types (Table 1). Ten isolates of

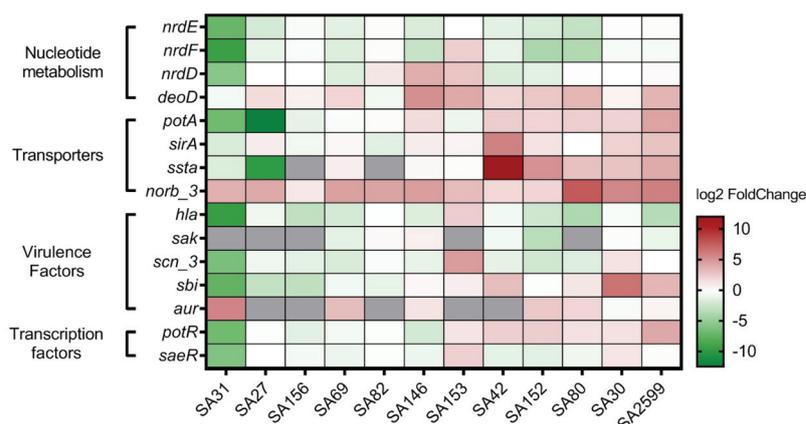


Figure 3. Confirmation of *S. aureus* gene expression dysregulation by *P. aeruginosa*. Twelve clinical SA-PA strain pairs were co-cultivated for 4 hours. RNAs were extracted and RT-qPCR were performed on 15 genes. The results are represented as fold change of expression (gene relative expression in coculture/gene relative expression in monoculture) on a heatmap. Under-expressed genes are indicated in green whereas over-expressed genes are indicated in red. No RNA detection is shown in grey. Pairs were hierarchically clustered by the Euclidean method.

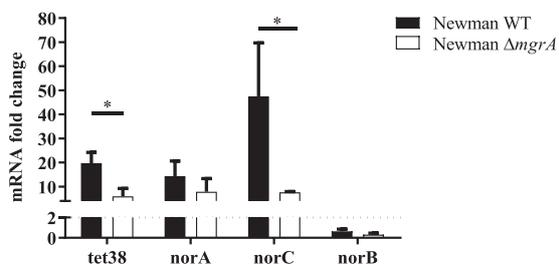


Figure 4. The *S. aureus* MgrA regulator is important for *nor* gene over-expression. Cocultures of *S. aureus* Newman wild type (WT) and $\Delta mgrA$ mutant with PA30 were performed. RNAs were extracted at 8 hours and *nor* gene expression was monitored by RT-qPCR. The results are shown as the mean + standard deviation of three independent experiments. Dotted lines indicate fold change = 2. Statistical analysis was performed by unpaired t-test (*P < 0.05).

P. aeruginosa were mucoid and four secreted pigmentation, which was representative of the collection of all the isolates. Gene expression was assessed by RT-qPCR for the two categories most impacted: virulence factors and transporters (Fig. 3). Regarding virulence factors, we confirmed the over-expression of the aureolysin encoding gene in 6 of the 7 strains that expressed the gene. For *sbi*, 5 out of 12 strains presented over-expression and 5 out of 12 presented decreased expression, meaning that there was no clear profile of *P. aeruginosa*'s impact on this gene expression. For the other virulence genes tested, we observed reduced expression in the majority of the strains (10/12 for *hla*, 5/7 for *sak*, 7/12 for *saeRS* and 8/12 for *scn*) (Fig. 3).

For transporter encoding genes, we confirmed the over-expression of *pot* genes and the *sstA* gene in 6/12 and 7/10 strains, respectively. Noticeably, we confirmed the up-regulation of *tet38* genes in 11/12 strains with a fold change ranging from 3 to 200. In addition, *deoD* gene upregulation was also confirmed in 9/12 strains, consistent with its operon structure with *tet38* gene²⁶.

The over-expression of the *tet38* gene is the most predominant transcriptomic alteration in our study and may be of great importance as it can affect the antibiotic susceptibility of *S. aureus*, an important element in the context of CF disease. Therefore, we aimed to better characterize this transcriptomic alteration.

Over-expression of the *tet38* gene is due to the dysregulation of the MgrA regulatory pathway that impacts other *nor* family genes. To decipher the molecular pathway involved in the over-expression of the *tet38* gene, we analyzed the expression of known regulators in the presence or absence of *P. aeruginosa*. Three transcriptional negative regulators of *tet38* have already been described: TetR21²⁶, SarZ²⁸ and MgrA²⁷. The expression of these regulators was quantified by RT-qPCR in coculture and compared to expression in monoculture. None of the *tetR21*, *sarZ* and *mgrA* RNA levels was affected by the presence of *P. aeruginosa* (Fig. S3).

However, it has been described that regulation by MgrA is dependent on its phosphorylation state²⁹ and that the deletion of *mgrA* induces increased expression of *tet38*²⁷. Therefore, we analyzed the impact of *P. aeruginosa* on *tet38* expression using a Newman $\Delta mgrA$ mutant (Fig. 4). The wild type Newman strain presented a 20-fold change over-expression of the *tet38* gene in the presence of *P. aeruginosa*, as we previously observed in clinical

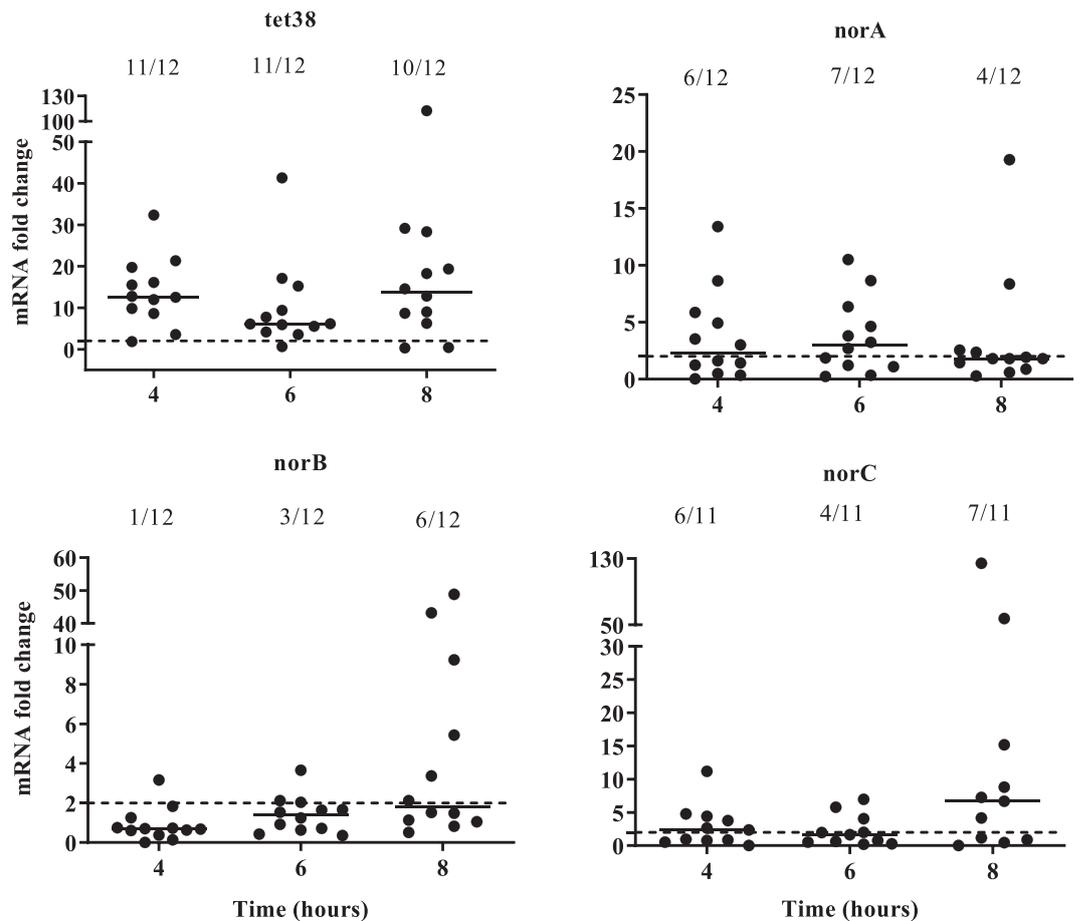


Figure 5. The over-expression of *S. aureus* *nor* family genes induced by *P. aeruginosa*. Mono- and cocultures with twelve clinical strain pairs were performed. RNAs were extracted and gene expression was monitored by RT-qPCR at 4, 6 and 8 hours. The results are represented as fold change expression. Dotted lines indicate fold change = 2. Numbers above each hour indicate the number of pairs with a fold change strictly higher than 2.

strains. This fold change was reduced to 6 for the $\Delta mgrA$ mutant. Therefore, it appears that the over-expression of the *tet38* gene is induced by an alteration of the MgrA regulatory pathway. These results were confirmed in *S. aureus* Lac isogenic strains (Fig. S4).

MgrA is also a transcriptional regulator of other *nor* family protein genes such as *norA*, *norB* and *norC*^{27,29,30}. Hence, the expression of *nor* genes in *S. aureus* was monitored throughout cocultures of the 12 *S. aureus* strains with *P. aeruginosa* (Fig. 5). The *tet38* gene was significantly overexpressed in the presence of *P. aeruginosa* throughout the 8 hours of the culture. The *norA* gene was over-expressed in at least 50% of cocultures (6/12 and 7/12) after 4 and 6 hours of culture and *norC* expression was increased at 4 and 8 hours in 6/11 and 7/11 strains, respectively (Fig. 5). *norB* was overexpressed only at 8 hours of culture in 50% of the strains tested.

From the analysis of expression in the $\Delta mgrA$ mutant in the *S. aureus* Newman strain, we concluded that over-expression of *norC* was dependent on MgrA integrity (Fig. 4). A milder effect was observed on *norA* over-expression. No overexpression of *norB* gene was observed with the *S. aureus* Newman strain. In the *S. aureus* Lac strain, we observed a diminution of *norA* and *norC* overexpression in the $\Delta mgrA$ mutant but the effect was less significant than on *tet38* gene expression (Fig. S4). Therefore, we concluded that the overexpression of *norA* and *norC* genes in the presence of *P. aeruginosa* was partially due to *mgrA* dysregulation.

The presence of *P. aeruginosa* induces over-expression of *nor* genes by specific and direct interaction.

To determine if a secreted product of *P. aeruginosa* induced the over-expression of *nor* genes, a transwell experiment was conducted in which cultures of *P. aeruginosa* and *S. aureus* were separated by a 0.4 μm filter. In these conditions, *nor* genes were not overexpressed (Fig. 6). The same results were obtained when *S. aureus* culture was exposed to supernatant of *P. aeruginosa* (Fig. S5), suggesting that at least a close interaction between the two species was necessary. Finally, to determine if the over-expression was specific to the interaction with *P. aeruginosa*, cocultures were conducted with other bacteria frequently associated with *S. aureus* in CF patients, such as *Burkholderia cenocepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* (Fig. 7). No over-expression was observed, suggesting that the effect was specific to the presence of *P. aeruginosa*. These results were confirmed with other clinical *S. aureus* strains (Fig. S6).

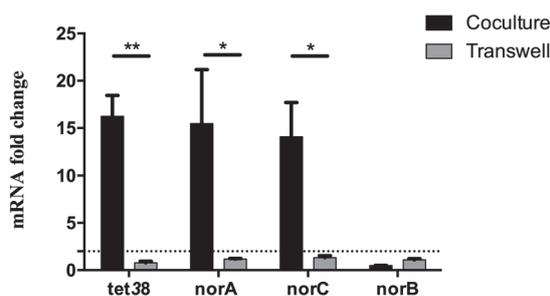


Figure 6. *S. aureus* *nor* gene over-expression requires close contact with *P. aeruginosa*. *S. aureus* was deposited onto the bottom of wells. *P. aeruginosa* was added either with *S. aureus* (black) or into the insert of transwells (gray). RNAs were extracted and *nor* gene expression was monitored by RT-qPCR. Dotted lines represent fold change = 2. The results are shown as the mean + standard deviation of three independent experiments on SA30-PA30 pair. Statistical analysis was performed by unpaired t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

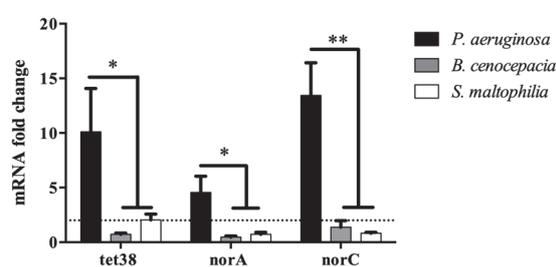


Figure 7. The overexpression of *S. aureus* *nor* genes is specifically induced by *P. aeruginosa*. *S. aureus* was mono- and cocultivated with *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* or *S. maltophilia*. RNAs were extracted and gene expression was monitored by RT-qPCR. Dotted lines indicate fold change = 2. The results represent the mean + standard deviation of three independent experiments on SA30-PA30 pair. Statistical analysis was performed by One-way Anova with Dunnett's multiple test correction (* $P_{adj} < 0.05$, ** $P_{adj} < 0.01$).

Over-expression of *nor* genes induces an increase of antibiotic resistance and internalization of *S. aureus* into epithelial cells. As Tet38 is involved in tetracycline resistance²⁷ and NorA and NorC are also implicated in quinolones (such as ciprofloxacin) uptake^{30,31}, the impact of coculture with *P. aeruginosa* on *S. aureus* antibiotic susceptibility was tested. Firstly, the MIC was determined for each of the 12 *S. aureus* strains used (Table S3). Monocultures and cocultures were then exposed to tetracycline and ciprofloxacin at MIC or 2xMIC. After plating on selective agar and numeration, the survival rate was determined by dividing the number of *S. aureus* after antibiotic treatment by the number of *S. aureus* without antibiotic treatment. A 3-fold increase in survival rate was observed at MIC and 2xMIC in the presence of *P. aeruginosa* (Fig. 8A,B).

In order to demonstrate that the over-expression of the *tet38* gene was responsible for tetracycline resistance, the impact of *P. aeruginosa* was tested on the RN6390 wild type strain and its isogenic $\Delta tet38$ mutant upon exposure to tetracycline. As expected, *P. aeruginosa* induced a higher survival rate of the RN6390 wild type strain after tetracycline exposure. On the contrary, it had no impact on the bacterial survival of the $\Delta tet38$ mutant after tetracycline exposure (Fig. 8C), confirming the role of the *tet38* gene in the enhancement of tetracycline resistance in the presence of *P. aeruginosa*.

Tet38 has also been described as being involved in pulmonary epithelial cell internalization²⁶, so the impact of the presence of *P. aeruginosa* on *S. aureus* cell internalization was tested using the Gentamicin protection assay. When A549 epithelial cells were infected with a monoculture of *S. aureus*, five percent of adherent bacteria were internalized into cells. When *S. aureus* was co-cultivated with *P. aeruginosa* before cell infection, 15% of *S. aureus* were internalized, meaning a 3-fold increase of the *S. aureus* internalization rate in the presence of *P. aeruginosa* (Fig. 9). No difference was observed in terms of bacterial adhesion onto A549 cells. To ensure that the effect we observed was not due to an alteration of the A549 cell layer by *P. aeruginosa* that could have facilitated *S. aureus* internalization, we performed an LDH measurement on the cell supernatant as an indicator of A549 cell viability (Fig. S7B). Although the LDH level was slightly higher for cells infected only with *P. aeruginosa*, we found no significant difference between the *S. aureus* infected and *S. aureus* plus *P. aeruginosa* co-infected cells. Indeed, the A549 co-infected cells had the lowest level of LDH. Moreover, microscopic observation of the cells revealed no difference between the mono- and co-infected cells (Fig. S7A). Therefore, it appeared that the presence of *P. aeruginosa* did not alter the A549 cells and the highest rate of *S. aureus* internalization was due to its direct impact on *S. aureus*. However, we could not be sure that the increase in the internalization rate was directly related to *tet38* overexpression. It could be the result of a modification of different factors involved in the internalization process, although we did not identify such factors in our transcriptomic analysis apart from the *tet38* gene.

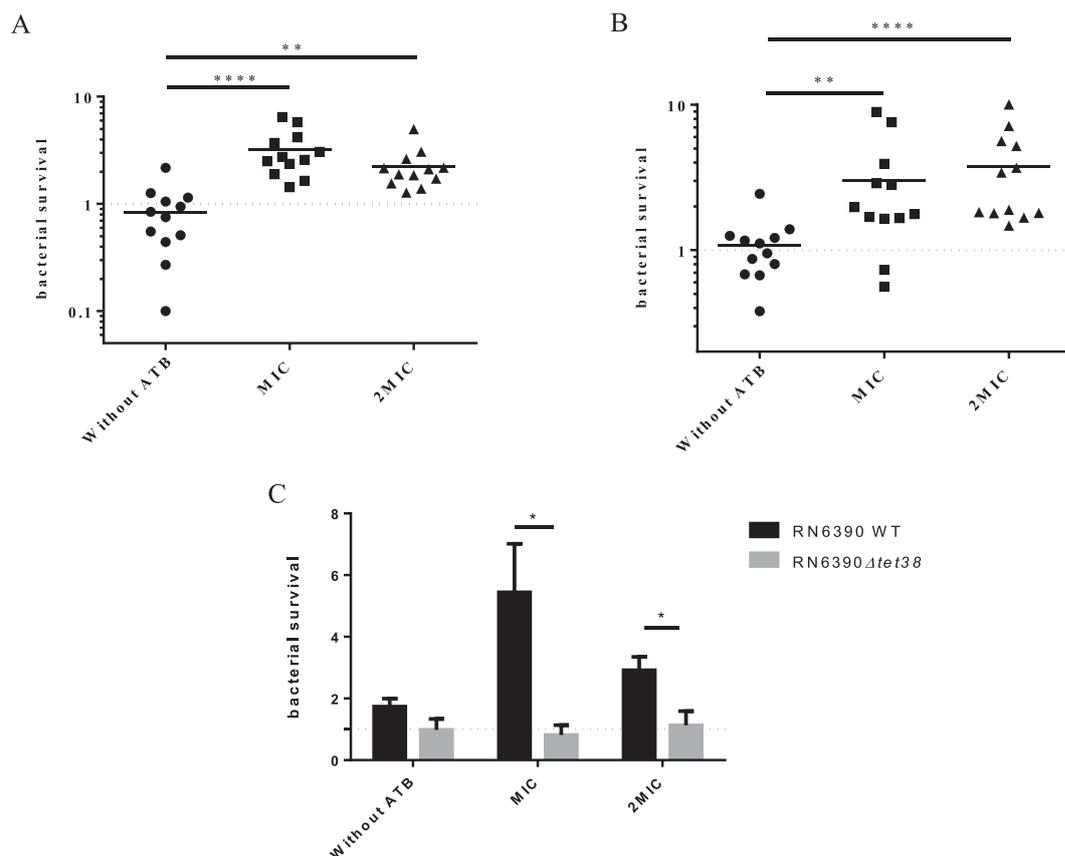


Figure 8. *S. aureus* antibiotic resistance increases when co-cultivated with *P. aeruginosa*. Twelve clinical *S. aureus* strains were mono- and cocultivated with coexisting *P. aeruginosa* strains and exposed to tetracycline (A) and ciprofloxacin (B) at MIC and 2xMIC. After 5 hours, cultures were plated on MSA to count remaining *S. aureus*. Bars represent the median and dotted lines bacterial survival equal to 1. Statistical significance was determined by One-way Anova with Dunnett's multiple test correction (** $P_{adj} < 0.01$, and **** $P_{adj} < 0.0001$). (C) *Tet38* is responsible for the increase of tetracycline resistance induced by *P. aeruginosa*. RN6390 and isogenic $\Delta tet38$ derivative were cultivated with and without *P. aeruginosa* and susceptibility to tetracycline was monitored. Statistical significance was determined by unpaired t-test (* $P < 0.05$) from three independent experiments. All the results are expressed as the number of surviving bacteria in coculture divided by the number of surviving bacteria in monoculture.

Discussion

The goal of this study was to investigate the impact of the interaction of coexisting *S. aureus* and *P. aeruginosa* on *S. aureus* at the transcriptional and phenotypical levels.

Firstly, we collected isolates from co-colonized CF patients and demonstrated that in 61% of cases, *S. aureus* was able to coexist with *P. aeruginosa* with no alteration of its growth. So far, it appears that coexistence of the two pathogens may be a frequent situation in the context of CF patients' lung infection. Previous studies described that early infectious strains of *P. aeruginosa* are more aggressive for *S. aureus* than the late infectious strains^{19,20}. In the present study, we did not find any correlation between the interaction type and the duration of *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-colonization. In the first studies, limited numbers of patients were studied (1 in Michelsen *et al.*, 2014 and 8 in Baldan *et al.*, 2014). Even in our present study, only 11 patients had competitive strain pairs, which might be not be enough to reach a conclusion. Up to now, it has been difficult to conclude whether the interaction type between the two species is linked to the evolution of the *P. aeruginosa* strain over the time of co-colonization. A larger cohort of patients would be needed to answer this question. Also, longitudinal clinical studies would be appropriate to analyze the kinetics of interaction evolution over time and determine how it could affect patients' health. Furthermore, the conditions and environmental factors leading to co-existence instead of competition require clarification, particularly through studies such one conducted recently that demonstrated the positive impact of hypoxia found in static mucus within CF airways on a coexisting interaction³².

The type of interaction may have an impact on the physiology of the two pathogens involved. In order to answer this question, we conducted a transcriptional study of the impact of *P. aeruginosa* on *S. aureus*.

In the context where *P. aeruginosa* inhibits *S. aureus* growth, transcriptomic modifications affect major metabolism pathways such as translation, Krebs cycle and genes involved in oxidative stress. The increase in the amount of tRNAs and ribosomal RNAs observed could be attributed to a decrease in translation efficiency. Regarding energetic metabolic pathways, we observed a down-expression of Acetyl-coA synthetase, a key factor metabolized

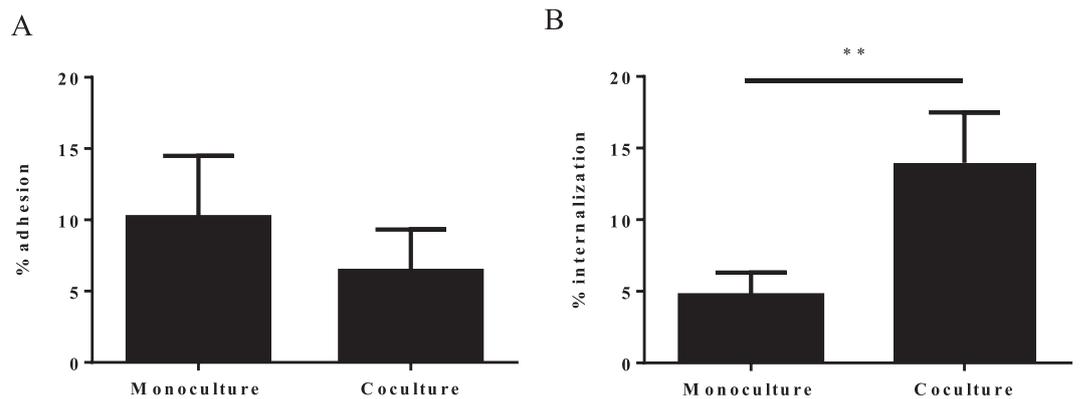


Figure 9. *S. aureus* internalization is increased within A549 epithelial pulmonary cells in the presence of *P. aeruginosa*. **(A)** Adhesion of *S. aureus* onto epithelial cells. A549 cells were infected at MOI 10:1 for *S. aureus* monoculture and 20:1 for *S. aureus*/*P. aeruginosa* coculture. After 2 hours of contact, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) to remove unattached bacteria and lysed with sterile water. Supernatants were plated on MSA to count *S. aureus*. The results are represented as the percentage of inoculum that adhered. **(B)** Internalization of *S. aureus* within epithelial cells. After 2 hours of contact, cells were treated with antibiotics and lysostaphine for one hour, lysed with sterile water and bacteria plated on MSA. The results are represented as the percentage of adhered cells that have internalized. All values represent the mean + standard deviation from three independent experiments with three strain pairs (SA27-PA27, SA31-PA31 and SA69-PA69). Statistical significance was determined by unpaired t-test (** $P < 0.01$).

into pyruvate to feed the Krebs cycle and produce energy. The down-regulation of expression observed may certainly lead to a defect in ATP production. Conversely, we observed the increased expression of several dehydrogenase enzymes, suggesting a shift from aerobic respiration to lactic acid fermentation to feed the Krebs cycle, as shown previously in laboratory strains^{33,34}. Some dehydrogenases, such as *adhE* and *gluD* genes, are also implicated in oxidative stress responses³⁵. All these major dysregulations observed are consistent with the lethal effect of *P. aeruginosa* on *S. aureus* in competitive interaction.

More genes were dysregulated when *S. aureus* and *P. aeruginosa* were coexisting. We observed a drastic modification in the nucleotide synthesis pathway with a down-regulation of genes involved in the *de novo* pathway (*nrd* operon) and upregulation of the *deoD* gene encoding a purine nucleoside phosphorylase involved in an alternative metabolic pathway for nucleotides when the *de novo* pathway is altered. We also observed a down-expression of genes involved in the classical energetic metabolism pathways: glycolysis and pentose phosphate pathways (*pgi*, *fbp*, *fda*). These results suggest nutritional competition between the two pathogens and indicate that in our conditions, *S. aureus* preferentially produced energy and nucleotides from sources other than glucose.

Finally, we observed the increased expression of several transporters, especially *tet38*, *norA* and *norC* genes. Curiously, the *tet38* gene belongs to the same transcription unit as the *deoD* gene. It is tempting to speculate that the overexpression of *tet38-deoD* operon may be linked to the down regulation of the *nrd* genes to compensate for the alteration of the *de novo* nucleotide synthesis pathway.

These genes are members of the Nor family and encode efflux pumps involved in antibiotic resistance. *Tet38* was the most impacted gene with 11 pairs of 12 for which we observed an increased expression throughout the coculture kinetic, whereas the over-expression of other *norA* and *norC* genes appeared on 7 pairs of 12 and 11 of 12 at 6 and 8 hours, respectively. Given that the pair 2599/2600 used for the RNA sequencing (RNAseq) was unable to upregulate *norA* and *norC* at 4 hours of coculture, it was expected that *norA* and *norC* genes would not appear in the RNAseq results. The over-expression of *tet38*, *norA* and *norC* genes appeared to be at least due to a dysregulation of the MgrA pathway. Indeed, the $\Delta mgrA$ mutant provoked a strong effect on *tet38* over-expression but only a slight effect on *norA* and *norC*. Thus, *mgrA* seems to be essential for *tet38* over-expression and other regulators must be implicated for the *norA* and *norC* genes. In addition, we were unable to observe clear *norB* up-regulation in the presence of *P. aeruginosa*. Indeed, MgrA acts as a repressor of *tet38*, *norA* and *norC* and an activator of *norB* in an *rsbU* positive background strain^{36,37}. This discrepancy may explain our results. Despite its role in *tet38* induction during coculture, *mgrA* expression was not affected by the presence of *P. aeruginosa*. However, it has been shown that the phosphorylation state of MgrA, regulated by RsbU and PknB factors, was a key mechanism for regulation of *nor* family gene expression²⁹. Thus, *P. aeruginosa* may induce a variation of MgrA phosphorylation leading to a modification of *nor* gene expression.

Nor proteins are responsible for antibiotic efflux (tetracycline and fluoroquinolone), and we demonstrated that *P. aeruginosa* increased the survival rate of *S. aureus* after exposure to tetracycline and ciprofloxacin. For tetracycline, the effect appears to be mainly due to *tet38*, as antibiotic resistance in presence of *P. aeruginosa* was eliminated in a *tet38* mutant. The same analysis could not be performed for *nor* genes due to the functional redundancy of the *norA*, *norB* and *norC* genes and the difficulty in obtaining triple mutants. *Tet38* is also able to interact with the CD36 receptor on pulmonary epithelial cells to favor *S. aureus* internalization³⁸. Indeed, in the presence of *P. aeruginosa*, we observed a higher rate of *S. aureus* internalization into epithelial cells. Internalized bacteria are more resistant to antibiotics and less detectable by the immune system³⁹. Our results suggest that by coexisting with *P. aeruginosa*, *S. aureus* could hide from the host immune system and be more resistant to antibiotics.

We did not identify the *P. aeruginosa* specific signal responsible for *S. aureus* gene expression dysregulation. However, we demonstrated that it seems to be specific to *P. aeruginosa* (no other species tested had the same effect) and requires very close proximity between *S. aureus* and *P. aeruginosa* to be effective. Transcriptomic analysis revealed that the *S. aureus* *potRABCD* operon for polyamine uptake and regulation exhibited significant fold change expression upon exposure to *P. aeruginosa*. The same effects were observed by Yoa and Lu²⁵ when exposing *S. aureus* to polyamines. Moreover, the exposure of *S. aureus* to spermine induces transcriptional modifications including over-expression of antibiotic efflux pumps such as *norA* and *tetM* genes and the decreased expression of many genes involved in carbohydrate metabolism and transport²⁴. These results are consistent with the reduced expression of genes involved in glycolysis and the pentose phosphate cycle described previously^{24,25}. Indeed, we observed the same profile after exposure to *P. aeruginosa* as other authors observed after exposure to spermine. Finally, *P. aeruginosa* presents polyamines at the outer surface of its membrane, more precisely putrescine and spermidine⁴⁰. Therefore, we suggest that the *P. aeruginosa* polyamines present at the outer surface may be a signal for *S. aureus* transcriptional modifications. Further investigation will be necessary to confirm this hypothesis.

To the best of our knowledge, this study is the first to characterize the transcriptomic profile of coexisting *S. aureus* and *P. aeruginosa* pairs in a clinical context. We demonstrate that this commensal-like interaction induces phenotypical changes in *S. aureus* such as increased antibiotic resistance and host cell internalization. These phenotypes may favor the persistence of *S. aureus* in the context of chronic infection. Since this state of coexistence is apparently solely attributable to *P. aeruginosa*, the selective advantage for *P. aeruginosa* leads to questions. Indeed, previous studies showed that cocultivation with *S. aureus* induces LPS mutation in *P. aeruginosa* associated with fitness gain and antibiotic resistance⁴¹, and that *S. aureus* exoproducts restore and enhance *P. aeruginosa* motility³². The state of coexistence could thus represent a trade-off allowing both pathogens to benefit mutually and maintain equilibrium. However, the impact of *S. aureus* on *P. aeruginosa* in this state of coexistence warrants further investigation.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture growth. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Tables 1 and S1. The clinical strains were originally isolated by the Institute for Infectious Agents from sputum samples of patients followed-up in the two CF Centers of Lyon (Hospices civils de Lyon, France). The strains were collected between May 2016 and June 2017 from 36 different patients. The size of the colonies, pigmentation and mucoid phenotype were determined after 24 h of culture on TSA. Hemolysis type was determined after 24 h of culture on Columbia agar (COS). MLST clonal complex assignment was inferred from microarray analysis⁴².

The $\Delta tet38$ mutant of *S. aureus* RN6390 strain was obtained using the pMAD vector⁴³. The two DNA fragments corresponding to the chromosomal regions upstream and downstream of the *tet38* coding sequence were amplified by PCR using primers listed in Table S2. They were subsequently cloned into the pMAD vector using the In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech). The resulting plasmid was electroporated into the RN4220 recipient strain and then transferred to RN6390. Growth at non-permissive temperature (44 °C) was followed by several subcultures at 30 °C and 37 °C to promote double crossing over as previously described⁴⁴.

All the strains were grown in Brain Heart Infusion (BHI, BBL[™] Difco) with shaking at 200 rpm at 37 °C overnight. Cultures were diluted to 0.1 OD_{600nm} and incubated for 2.5 hours (37 °C, 200 rpm). Bacteria were spun down at 4000 rpm for 10 min and re-suspended in fresh BHI medium to 2 OD_{600nm}. Ten ml of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* and *S. maltophilia* suspension were added to 10 ml of BHI for monocultures. Ten ml of *S. aureus* suspension were mixed with respectively 10 ml of *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* or *S. maltophilia* for cocultures. Cultures were grown for 8 h. Every two hours, cultures were plated on mannitol salt agar (MSA, BBL[™] Difco) and cetrимide (Difco[™]) for *S. aureus* or *P. aeruginosa* counts, respectively.

For supernatant exposure, 10 mL of *S. aureus* culture were added to 10 ml of supernatant from 8 hours culture of *P. aeruginosa*.

Transwell[®] (Corning) preliminary experiment demonstrated that bacteria were not able to cross the 0.4 μm filter of the insert. *S. aureus* and *P. aeruginosa* suspensions from 2.5 h culture were pelleted and re-suspended to OD_{600nm} = 1 for *P. aeruginosa* and OD_{600nm} = 0.33–0.5 for *S. aureus*. The Transwell[®] experiment was carried out as previously described^{45,46} with a few modifications. For wells without insert, 400 μL of *S. aureus* OD_{600nm} = 0.5 suspension and 200 μL of either BHI or *P. aeruginosa* were added. For wells with insert, 600 μL of *S. aureus* 0.33 OD_{600nm} were deposited into the wells while 200 μL of either BHI or *P. aeruginosa* were placed onto the insert. The Transwell[®] system was incubated at 37 °C for 8 hours.

Staphylococcus aureus growth inhibition on TSA. From overnight cultures, *S. aureus* and *P. aeruginosa* suspensions were diluted to OD₆₀₀ = 0.5 and 100 μl of *S. aureus* suspension were spread uniformly onto TSA plates. Then, 5 μl of *P. aeruginosa* were added at the center of the plates. The plates were incubated at 37 °C. The competitive phenotype was characterized by an inhibition halo of *S. aureus* growth, which was measured. The strains were considered as coexisting in the absence of inhibition halo.

Genome sequencing and annotation. Sequencing libraries were prepared from 1 ng of SA2597 and SA2599 DNA extracted using the DNA Isolation Kit (MO BIO). Library preparation was performed with the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina) and index kit (Illumina). Library validation was performed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) to control the distribution of fragmented DNA. WGS was performed with an Illumina HiSeq (Illumina) to generate 150-bp paired end reads. Genomes were sequenced with an average coverage of 130x. Adapters and other illumina-specific sequences were cut from the reads for each set of raw data. Furthermore, Trimmomatic v0.36⁴⁷ was used to perform an additional trimming step using a sliding window with an average quality threshold of 20. Data were checked for quality by FastQC v0.11.6 (S. Andrews,

2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Assemblies were performed using SPAdes v3.11.1⁴⁸. Contigs smaller than 200 bp or with a coverage threshold smaller than 2 were removed manually. Assembly quality control was performed using Quast v4.6.1⁴⁹. Genome annotation was processed through Prokka v1.13 including ncRNA prediction⁵⁰.

To compare CDS and ncRNA from SA2597 and SA2599, the N315 strain (NC_002745.2) was used as a reference. Refseq numbers were gathered from N315 and used as ID tags for common genes. For non-common genes, CDS and ncRNA from SA2597 and SA2599 were blasted with each other with a coverage and identity of 90%. Finally, refseq numbers were also used to gather KEGG numbers and perform functional classification with the Kyoto database. The complete genome sequences for the SA2597 and SA2599 strains were deposited in GenBank under the accession numbers GCA_005280135.1 and GCA_005280145.1.

Transcriptomic analysis. Cultures and transcriptome sequencing were performed in duplicates or triplicates. The OD₆₀₀ of each culture was normalized to 1.0 at a time of 4 hours for the mono and cocultures. One mL was centrifuged for 5 minutes at 13,000 rpm. Bacteria were treated with lysostaphin (2.5 mg/mL) and lysozyme (50 mg/mL) prior to RNA extraction using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). RNAs were treated with TURBO DNA-free™ (Invitrogen). rRNAs were depleted using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina). The cDNA libraries were compiled using the TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit (Illumina). The quantification and quality of the DNA libraries was evaluated by Bioanalyzer. The libraries were sequenced using Illumina Hi-Seq 2500 with High-Output (HO) mode, using a V4 chemistry sequencing kit (Illumina). Reads were then processed to remove adapter sequences. Poor quality reads were excluded by Trimmomatic⁴⁷, using a sliding window with an average quality threshold of 20. Each RNAseq read sample was mapped against its own genome through Bowtie2 v2.3.0 with a sensitive local alignment method⁵¹. Output files were sorted by read names and converted into BAM format using Samtools v1.3.1. Reads were counted on all feature types (CDS, nc/tm/rRNA) using a union mode on Htseq-count v0.6.1 software⁵². To estimate the enrichment values for the differential expression analysis, statistical analysis was done using R v3.3.3 and DEseq2 v1.14.1⁵³. Gene expression was considered as dysregulated when: (i) the fold change between co-culture and monoculture was at least 4-fold, (ii) the dysregulation was observed in the two pairs of strains, (iii) the dysregulation was specific to coexistence or competition state. The RNAseq data that support our findings are available in the SRAdatabase under the BioprojectID PRJNA552713, PRJNA552715, PRJNA552786, PRJNA554237, PRJNA554233, PRJNA554237.

RT-qPCR. RNA extractions were performed using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). A DNase treatment was performed on 10 µg of RNAs using TURBO DNA-free™ (Invitrogen). The absence of contaminating gDNA was controlled by PCR. cDNA was synthesized from 1 µg RNA using the Reverse Transcription system kit (Promega). The qPCR reactions were performed with PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher) following the manufacturer's instructions. The target genes and primers used are listed in Table S2. The house-keeping genes *gyrB* and *hu* were used as endogenous control. Gene expression analyses were performed using the ΔCt method.

Antibiotic resistance assay. MICs of tetracycline and ciprofloxacin (Sigma) were determined by BHI micro-dilution (Table S3). For the antibiotic resistance assay, 4 hour mono-cultures of *S. aureus* and cocultures of *S. aureus/P. aeruginosa* were diluted to OD_{600nm} = 0.002 or 0.004, respectively, and exposed to antibiotics at MIC and 2xMIC for 5 hours at 37 °C at 200 rpm in 1 mL of BHI. Cultures were plated on MSA agar plates for *S. aureus* counts. The percentage of bacterial survival after antibiotic treatment was determined by dividing the number of *S. aureus* after antibiotic treatment by the number of *S. aureus* without antibiotic treatment.

Internalization within A549 cells. *S. aureus* monocultures and *S. aureus/P. aeruginosa* cocultures were performed for 4 hours as previously described⁵⁴. A549 cells were grown in DMEM GlutaMAX™ medium (Gibco) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (37 °C, 5% CO₂). 24-well tissue culture plates were seeded at 80 000 cells per well. After 24 hours, the cells were washed twice with 1 ml of Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco) and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 for mono-culture and 20:1 for coculture. Cells were incubated for 2 hours, then washed once in PBS to remove non-adherent bacteria and incubated for 1 hour in DMEM GlutaMAX™ supplemented with 400 µg/mL gentamicin (Sigma), 100 µg/mL polymyxin B (Sigma) and 10 µg/mL lysostaphin to kill extra-cellular bacteria. Cells were washed again with PBS once and lysed with deionized water. Cell lysates were plated on MSA to quantify the intracellular bacteria.

Ethical statement. All the methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

The complete genome sequences for the SA2597 and SA2599 strains have been deposited in GenBank under the accession number GCA_005280135.1 and GCA_005280145.1.

The RNAseq data that support our findings are available in the SRAdatabase under the BioprojectID PRJNA552713, PRJNA552715, PRJNA552786, PRJNA554237, PRJNA554233, PRJNA554237.

Received: 25 June 2019; Accepted: 26 October 2019;

Published online: 12 November 2019

References

- Armbruster, C. E. *et al.* Indirect Pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Polymicrobial Otitis Media Occurs via Interspecies Quorum Signaling. *mBio* **1**, e00102-10–e00102-19 (2010).
- Korgaonkar, A., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P. & Whiteley, M. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1059–1064 (2013).
- Sibley, C. D. *et al.* Discerning the Complexity of Community Interactions Using a *Drosophila* Model of Polymicrobial Infections. *PLoS Pathog.* **4**, e1000184 (2008).
- Vega, N. M., Allison, K. R., Samuels, A. N., Klempner, M. S. & Collins, J. J. *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14420–14425 (2013).
- Zolin, Orenti, Naehrlich & van Rens. ECFS Patient Registry Annual Data Report 2017. (2019).
- Hubert, D. *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 497–503 (2013).
- Wolter, D. J. *et al.* *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **57**, 384–391 (2013).
- Hoffman, L. R. *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19890–19895 (2006).
- Maselli, J. H. *et al.* Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr. Pulmonol.* **35**, 257–262 (2003).
- Junge, S. *et al.* Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **11**, e0166220 (2016).
- Raidt, L. *et al.* Increased Prevalence and Resistance of Important Pathogens Recovered from Respiratory Specimens of Cystic Fibrosis Patients During a Decade. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 700–705 (2015).
- Hudson, V. L., Wielinski, C. L. & Regelmann, W. E. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J. Pediatr.* **122**, 854–860 (1993).
- Sagel, S. D. *et al.* Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* Infection on Inflammation and Clinical Status in Young Children with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* **154**, 183–188.e3 (2009).
- Wakeman, C. A. *et al.* The innate immune protein calprotectin promotes *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* interaction. *Nat. Commun.* **7** (2016).
- Hogan, D. A. *et al.* Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLOS ONE* **11**, e0149998 (2016).
- Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7** (2017).
- Mashburn, L. M., Jett, A. M., Akins, D. R. & Whiteley, M. *Staphylococcus aureus* Serves as an Iron Source for *Pseudomonas aeruginosa* during *In Vivo* Coculture. *J. Bacteriol.* **187**, 554–566 (2005).
- Pernet, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat. Commun.* **5**, 5105 (2014).
- Michelsen, C. F. *et al.* *Staphylococcus aureus* Alters Growth Activity, Autolysis, and Antibiotic Tolerance in a Human Host-Adapted *Pseudomonas aeruginosa* Lineage. *J. Bacteriol.* **196**, 3903–3911 (2014).
- Baldan, R. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of *Staphylococcus aureus* *In Vitro* and Murine Models of Co-Infection. *PLoS ONE* **9**, e89614 (2014).
- Limoli, D. H. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection. *mBio* **8**, e00186–17 (2017).
- Liu, Q., Yeo, W.-S. & Bae, T. The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes* **7** (2016).
- Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. **29** (2006).
- Yao, X. & Lu, C.-D. Characterization of *Staphylococcus aureus* Responses to Spermine Stress. *Curr. Microbiol.* **69**, 394–403 (2014).
- Yao, X. & Lu, C.-D. Functional Characterization of the potRABCD Operon for Spermine and Spermidine Uptake and Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **69**, 75–81 (2014).
- Truong-Bolduc, Q. C. *et al.* Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **83**, 4362–4372 (2015).
- Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J. & Hooper, D. C. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**, 2395–2405 (2005).
- Chen, P. R. *et al.* A new oxidative sensing and regulation pathway mediated by the MgrA homologue SarZ in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **71**, 198–211 (2009).
- Truong-Bolduc, Q. C. & Hooper, D. C. Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **192**, 2525–2534 (2010).
- Truong-Bolduc, Q. C., Strahilevitz, J. & Hooper, D. C. NorC, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1104–1107 (2006).
- Fournier, B., Aras, R. & Hooper, D. C. Expression of the Multidrug Resistance Transporter NorA from *Staphylococcus aureus* Is Modified by a Two-Component Regulatory System. *J. Bacteriol.* **182**, 664–671 (2000).
- Pallett, R. *et al.* Anaerobiosis influences virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates and the interaction with *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **9**, 6748 (2019).
- Filkins, L. M. *et al.* Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J. Bacteriol.* **197**, 2252–2264 (2015).
- Tognon, M., Köhler, T., Luscher, A. & van Delden, C. Transcriptional profiling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during *in vitro* co-culture. *BMC Genomics* **20** (2019).
- Korem, M., Gov, Y. & Rosenberg, M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb. Pathog.* **48**, 74–84 (2010).
- Truong-Bolduc, Q. C., Ding, Y. & Hooper, D. C. Posttranslational Modification Influences the Effects of MgrA on norA Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **190**, 7375–7381 (2008).
- Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J. & Lee, C. Y. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 1899–1910 (2006).
- Truong-Bolduc, Q. C., Khan, N. S., Vyas, J. M. & Hooper, D. C. Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. *Infect. Immun.* **85**, e00862–16 (2017).
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S. & Peters, G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 170–176 (2014).
- Johnson, L., Mulcahy, H., Kanevets, U., Shi, Y. & Lewenza, S. Surface-Localized Spermidine Protects the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane from Antibiotic Treatment and Oxidative Stress. *J. Bacteriol.* **194**, 813–826 (2012).
- Tognon, M. *et al.* Co-evolution with *Staphylococcus aureus* leads to lipopolysaccharide alterations in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.*, <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.83> (2017).

42. Tristan, A. *et al.* Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PLoS One* **7**, e51172 (2012).
43. Arnaud, M., Chastanet, A. & Debarbouille, M. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6887–6891 (2004).
44. Boisset, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* **21**, 1353–1366 (2007).
45. Nguyen, A. T. *et al.* Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Retain Iron-Regulated Antimicrobial Activity against *Staphylococcus aureus* through the Action of Multiple Alkylquinolones. *Front. Microbiol.* **7** (2016).
46. Nguyen, A. T., Jones, J. W., Ruge, M. A., Kane, M. A. & Oglesby-Sherrouse, A. G. Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **197**, 2265–2275 (2015).
47. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 2114–2120 (2014).
48. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* **19**, 455–477 (2012).
49. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 1072–1075 (2013).
50. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 2068–2069 (2014).
51. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25 (2009).
52. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **31**, 166–169 (2015).
53. Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y. & Dillies, M.-A. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* **11**, e0157022 (2016).
54. Trouillet, S. *et al.* A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J. Microbiol. Methods* **86**, 145–149 (2011).

Acknowledgements

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, grant number ECO20170637499 to LC; Finovi foundation to KM and FV. We thank Xavier Charpentier of CIRI, Lyon-France, for discussing the work and providing valuable advice.

Author contributions

P.B., L.C., S.B., F.V. and K.M. designed and analyzed the experiments. P.B. conducted the experiments. S.B. conducted and analyzed all bioinformatics works. A.D.J. collected the clinical samples from C.F. patients. K.M. and F.V. coordinated the project. P.B. and K.M. collected the data and wrote the first draft of the manuscript. All the authors contributed to manuscript revision and read and approved the submitted version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52975-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Résultats expérimentaux

La plupart des souches de co-infections de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* coexistent, une condition n'impactant pas la santé des patients atteints de la mucoviscidose.

Most of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infecting isolates coexist, a condition that do not impact clinical outcomes in Cystic fibrosis patients.

Submitted in *Frontiers Microbiology*, 2020

Paul Briaud, Bastien Sylvère, Laura Camus, Marie Boyadjian, François Vandenesch, Philippe Reix, Anne Doléans-Jordheima and Moreau Karen.

Résultats expérimentaux

Introduction

Les patients CF souffrent d'infections polybactériennes chroniques, conduisant à une diminution de la fonction respiratoire et, dans la majorité des cas, entraînant la mort du patient. La relation entre colonisation bactérienne et sévérité de la maladie a été étudiée et des corrélations ont pu être établies. En effet, les infections par *B. cepacia* causent un déclin rapide de la fonction respiratoire et sont associées à une mortalité élevée des patients CF (Dentini et al., 2017). Ce phénomène, appelé « cepacia syndrome », peut être expliqué par les nombreux facteurs de virulence produits, impliqués dans la lyse cellulaire, à l'échappement au système immunitaire et à la résistance aux composés anti-microbiens (anticorps, peptides, antibiotiques) (Loutet and Valvano, 2010).

Concernant nos bactéries d'intérêts, plusieurs études ont été menées pour identifier si les mono-infections par *S. aureus* ou *P. aeruginosa* ou les co-infections par ces deux bactéries étaient associées à un avenir respiratoire plus sévère. Ces études ont révélé des effets contradictoires sur la colonisation par ces deux bactéries sur les fonctions pulmonaires. La co-colonisation précoce par *S. aureus* et *P. aeruginosa* chez les enfants CF est responsable d'une plus grande augmentation des marqueurs pro-inflammatoires ainsi qu'une survie à 10 ans beaucoup plus faible (Hudson et al., 1993; Sagel et al., 2009). Les enfants, colonisés par *P. aeruginosa* seul, présentent néanmoins des marqueurs inflammatoires plus élevés que les mono-infections par *S. aureus* (Hudson et al., 1993; Sagel et al., 2009). Néanmoins, Ahlgren et al (Ahlgren et al., 2015) montre que les patients colonisés par *S. aureus* présentent moins d'exacerbations que les patients uniquement colonisés par *P. aeruginosa*. Ces résultats ont été confirmés plus tard en montrant que les patients co-infectés possédaient un bilan clinique général moins sévère que les patients mono-infectés par *P. aeruginosa* (Cios et al., 2019a). En séparant *S. aureus* suivant sa susceptibilité à la méthiciline, les patients colonisés par des souches MRSA présentent un niveau de détérioration clinique (nombre d'exacerbation, nombre de traitement par intra-veineuse (IV) et hospitalisation) plus élevé que les patients MSSA. Ce degré de sévérité est conservé en co-infection (MRSA+*P. aeruginosa* > MSSA+*P. aeruginosa*) mais la mono-infection par *P. aeruginosa* reste la plus sévère (Hubert et al., 2013). Enfin, une étude s'intéressant sur le lien entre CFRD et infection montre que les patients CF diabétiques

Résultats expérimentaux

ont plus de risque d'être co-colonisés par *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Il semble s'établir que les patients mono-infectés par *P. aeruginosa* ont un bilan clinique plus sévère que les patients mono-infectés par *S. aureus* mais, que le statut de co-infection reste flou. De plus, aucune de ces études n'a pris en compte l'état d'interaction entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* chez les personnes co-infectées. En effet notre étude 1 montre que le phénotype de co-existence engendre des modifications transcriptomiques et phénotypiques qui pourrait aggraver le tableau clinique (augmentation résistance aux antibiotiques et de l'internalisation).

Notre étude a été menée pour mieux caractériser l'état clinique des patients mono- et co-infectés par *S. aureus* et *P. aeruginosa* tout en regardant, chez ces derniers, si l'état d'interaction entre ces deux bactéries a un impact sur la sévérité de la maladie. Les données cliniques de 212 patients de la cohorte lyonnaise ont été récupérées (données démographiques e.g IMC, âge, sexe, génotype CFTR, CFRD ; données de sévérité de la maladie e.g nombre d'exacerbation, d'hospitalisation, traitement IV, malnutrition ; statut infection *S. aureus/P. aeruginosa*). De plus, pour les patients co-infectés, des tests de compétition sur gélose TSA ont été effectués pour connaître le statut d'interaction. Les patients ont ensuite été séparés en 3 groupes différents suivant leur statut infectieux : *S. aureus* seul, *P. aeruginosa* seul ou co-infection. Une analyse par FAMD (Factor Analysis of Mixed Data) a été effectuée pour détecter les similarités et l'hétérogénéité entre les patients en utilisant les variables qualitatives (sexe, génotype CFTR, CFRD, malnutrition) et quantitatives (IMC, âge, nombre d'exacerbations, nombre de jours et durée d'hospitalisation, FEV1 et nombre de traitement IV). Ensuite, des analyses statistiques en utilisant des tests de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ou exacte de Fisher ont été réalisés suivant si les données sont quantitatives ou qualitatives.

Les résultats montrent que les patients mono-infectés par *S. aureus* présentent un bilan clinique meilleur que les autres groupes (*P. aeruginosa* seul ou co-infection). De plus les personnes co-infectées (sans distinction du type d'interaction) ne présentent pas de tableau clinique différent avec les patients mono-infectés par *P. aeruginosa*. Enfin, l'état de coexistence représente une très grande proportion (65,3%) de souches isolées de patients co-infectés. Comparé à une mono-infection par *S.*

Résultats expérimentaux

aureus, les couples d'isolats en compétition aggravent plus les fonctions pulmonaires que les couples d'isolats en coexistence.

1 **Most of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infecting**
2 **isolates coexist, a condition that may impact clinical outcomes in Cystic**
3 **Fibrosis patients.**

4

5 Paul Briaud ^{a,*} (ORCID 0000-0001-7530-6803), Sylvère Bastien ^{a,*} (ORCID 0000-0002-3687-
6 8646), Laura Camus^a (ORCID 0000-0003-1335-8901), Marie Boyadjian^b, Philippe Reix^b
7 (ORCID 0000-0002-9192-8335), Catherine Mainguy^b, François Vandenesch ^{a,c} (ORCID 0000-
8 0001-9412-7106), Anne Doléans-Jordheim^c (ORCID 0000-0003-4985-3955) and Karen
9 Moreau^{a,#} (ORCID 0000-0001-6297-3543).

10

11 ^a CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon; Inserm U1111;
12 Ecole Normale Supérieure de Lyon; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5308; Lyon, France

13 ^b Pediatric Pulmonology Department, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Hospices civils de Lyon,
14 UMR5558, Lyon, France.

15 ^c Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

16

17 Running title: Coexistence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in CF

18 #Address correspondence to karen.moreau@univ-lyon1.fr

19 *PB and SB contributed equally to this work. Author order was determined on the basis of lab
20 position.

21

22

23 **Abstract:**

24

25 *Staphylococcus aureus* (SA) is the major colonizer of the lung of cystic fibrosis (CF) patient
26 during childhood and adolescence. As patient aged, the prevalence of SA decreases and
27 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) becomes the major pathogen infecting adult lungs. Nonetheless,
28 SA remains significant and patients harbouring both SA and PA are frequently found in
29 worldwide cohort. Impact of coinfection remains controversial. Furthermore, co-infecting
30 isolates may compete or coexist. The aim of this study was to analyse if co-infection and
31 coexistence of SA and PA could lead to worse clinical outcomes. The clinical and
32 bacteriological data of 212 Lyon CF patients were collected retrospectively, and patients were
33 ranked into three groups, SA only (n=112), PA only (n=48) or SA plus PA (n=52). In addition,
34 SA and PA isolates from co-infecting patients were tested *in vitro* to define their interaction
35 profile. Sixty five percent (n=34) of SA/PA pairs coexist. Using univariate and multivariate
36 analysis, we confirm that SA patients have a clinical condition less severe than others, and PA
37 induce a poor outcome independently of the presence of SA. FEV1 is lower in patients infected
38 by competition strain pairs than in those infected by coexisting strain pairs compared to SA
39 mono-infection. Coexistence between SA and PA may be an important step in the natural
40 history of lung bacterial colonization within CF patients.

41

42

43 **Keywords:** Cystic Fibrosis, infection, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,
44 clinical outcome.

45

46 **Introduction:**

47

48 Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic disease among Caucasian population that
49 affects multiple organs and causes various complications associated with patient death such as
50 cystic fibrosis liver disease (1) (CFLD) or cystic fibrosis related diabetes (2) (CFRD) (1, 2).
51 However, the first cause of morbidity and mortality in CF remains the progressive decrease in
52 pulmonary function leading to an obstructive syndrome (3). This decline is generally due to the
53 continuous inflammation provoked by polymicrobial infections (3).

54 The main clinically significant bacteria are *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas*
55 *aeruginosa* (PA). SA infection occurs early in children and affects up to 80% of patients aged
56 5-19 years [4]. In early childhood, SA infection is responsible for increasing inflammatory
57 markers [5,6] and in adolescence, patients with high SA density in throat swabs present
58 deterioration of lung function [7]. However, despite the implication of SA in worse clinical
59 status, PA, which becomes the dominant pathogen of the respiratory tract in adulthood [4] (up
60 to 60% of patients > 18 years), remains traditionally the most feared pathogen due to its strong
61 association with most severe clinical outcomes, such as a more robust inflammation, an increase
62 in the number of exacerbations and a decrease in forced expiratory volume in one second
63 (FEV1) [8-11].

64 Even if SA colonization decreases as patients aging, SA infection concerns more than 30% of
65 CF adults (4). Among these cases, co-infection by PA and SA remains significant (5). However,
66 it is difficult to determine whether this co-infection is a transitional stage between SA alone and
67 PA alone or whether permanent co-infections with these two bacteria exist. Several *in vitro*
68 studies deciphered the relationships between SA and PA in a context of pulmonary co-infection
69 (6–10). According to recent studies, an evolution occurs regarding SA and PA clinical isolates
70 interaction. PA early-colonizing isolates show a strong antagonism towards SA strains (7, 8)

71 especially by producing anti-staphylococcal compounds, leading to a competition state (10).
72 However, PA isolated from chronic lung infection lack this competitiveness and SA succeeds
73 to coexist durably with PA (6, 9, 11). In this way, we previously demonstrated that in this
74 context of coexistence without antagonism, the two bacteria may cooperate to persist more
75 easily in lungs (Briaud *et al.*, 2019).

76 Only few studies investigated the impact of SA-PA co-infection and clinical outcomes. In
77 addition, none of them considered the interaction state (competition vs coexistence) between
78 SA-PA. So far, available data have shown conflicting results on the link between SA-PA co-
79 colonization and clinical outcomes. Ahlgren *et al.*, did not find a significant clinical difference
80 in adult patients co-colonized with SA plus PA compared to patient colonized solely by PA
81 (12). Two studies highlighted a higher respiratory decline and rate of hospital admission for
82 patients infected by PA alone in comparison with patients co-infected by SA-PA or by SA alone
83 (5, 13). Finally, other studies reported that SA-PA co-infection is associated with a worse
84 clinical outcome (14–17).

85 The aim of the study was to better characterize (i) co-infected patients with demographic data
86 (age, BMI, gender) and (ii) the interaction state (competition or coexistence) between the two
87 bacterial species. We also examined the consequence of SA-PA co-infection and SA-PA
88 interaction state (competition vs coexistence) on pulmonary functions (FEV1%) and clinical
89 outcomes (e.g. number of exacerbations, number of hospitalization). By computing
90 demographic and clinical data with pulmonary infectious status, we gain more information
91 about the impact of SA and PA infections and interactions in CF patient's health.

92

93 **Materials and Methods:**

94

95 **Patients:**

96 The clinical and bacteriological data of CF patients supervised at the two CF Centers in Lyon,
97 France, (CRCM: Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose) were collected
98 from February 2017 to August 2018.

99 The inclusion criterion was a stable microbiological status for SA and /or PA colonization,
100 defined by the following criteria: i) at least three respiratory samples collected for each patient
101 throughout the period considered (ii) at least two months between two successive samples (iii)
102 all samples collected during the study for a patient had the same status with respect to the
103 presence of SA and / or PA. The patients who did not match the criteria, or who were not co-
104 colonized by SA or PA were excluded.

105 This study was submitted to the Ethics Committee of the Hospice Civil de Lyon (HCL) and
106 registered under CNIL No 17-216. All patients were informed of the study and did not oppose
107 to the use of their data.

108

109 **Clinical data gathering:**

110 Clinical data were extracted from computerized medical files (Easily®). Data collected were:
111 gender, age at the time of the last sampling, CFTR genotype classified between severe and
112 moderate genotype regardless of clinical severity (5, 18), pancreatic insufficiency defined by a
113 faecal elastase < 200µg/g, CF-related diabetes (CFRD) or a carbohydrate intolerance, cirrhosis,
114 an oral or enteral supplementation and/or an undernourishment (defined as a body mass index
115 (BMI) (weight/height^2) lower than 17kg/m² in an adult and -2 standard deviations (SD) in a
116 child according to the gender and age). The pulmonary function was defined by the FEV1
117 expressed as a percentage of the predicted value (%pred). We also gathered the number of
118 hospitalizations, the length of hospital stays and the number of exacerbations during the 9
119 months preceding the last sample.

120

121 **Microbiology:**

122 The microbiological composition of each respiratory sample was determined by the Institute
123 for Infectious Agent, HCL. The interaction state (coexistence or competition) of SA-PA pairs
124 was defined by agar competition assay as previously described (Briaud *et al.*, 2019). Briefly,
125 SA and PA isolates recovered from co-infected patient's expectorations were cultured in 10ml
126 of BHI, at 37°C, 200 rpm. From overnight cultures, SA and PA suspensions were diluted to
127 $OD_{600nm} = 0.5$. Then, 100µL of SA suspension was spread uniformly onto trypticase soy agar
128 (TSA) plates. After a drying time, 5µl of PA suspension were spotted at the centre of the plates.
129 The plates were incubated at 37°C for 24 hours. The competitive phenotype was characterized
130 by an inhibition halo of SA growth. In absence of inhibition halo, isolates were defined in
131 coexistence.

132

133 Based on these microbiological analyses, the patients were categorized into four groups: (i) SA
134 alone, (ii) PA alone, (iii) or SA-PA in competition, and (iv) SA-PA in coexistence.

135

136 **Statistical analysis:**

137 Two different analyses were performed using the same process: (i) SA vs PA vs SA+PA, and
138 (ii) SA vs PA vs SA+PA in coexistence vs SA+PA in competition.

139 Factor Analysis of Mixed Data (FAMD) was used for initial data screen. Then, univariate
140 analysis was done to determine significant differences between groups. For continuous
141 variables (age, BMI, FEV1, number of hospitalizations, length of hospitalization and number
142 of exacerbation), Kruskal-Wallis tests were used to identify whether a population was different
143 from the others. Afterward, to individually test each pair of populations from significant
144 Kruskal-Wallis tests, a Mann-Whitney Wilcoxon tests was used. Fisher's exact tests were
145 performed to compare categorical variables (CFTR genotype, gender, Denutrition, pancreatic

146 insufficiency, CFRD, liver cirrhosis, enteral nutrition and food supply). For multiple
147 comparisons, tests were corrected by a Bonferroni method and statistical significance was set
148 with a q-value threshold at 0.05. Finally, a multinomial log-linear model (nnet package (19))
149 was used to determine significant associations between infectious status groups and variables
150 retained by Akaike information criterion (AIC) (20). The AIC analysis was performed in order
151 to identify the smallest and fittest set of variables describing our data. An adjusted odds-ratio
152 with 95% confidence interval was reported for each final variable. All analyses were performed
153 using R v3.5.3 (21).

154

155 **Results:**

156

157 **Clinical characteristics of patients**

158 Of the 655 CF patients monitored in Lyon hospitals, we selected patients with at least three
159 respiratory specimens with SA and / or PA during the study period. 276 patients were excluded
160 because of the absence of the three required samples. Sixty-five patients had neither SA nor PA
161 infection. Finally, 48 and 54 patients were excluded because of unstable SA-PA co-colonization
162 during the period or the inability to assess their pulmonary function (age <4 years). Finally, 212
163 patients with CF were included in this study.

164 The cohort consisted of 124 adults and 88 children with a mean age of 21.70 years (range 4-
165 69). The male-female ratio was homogeneous with approximately 51.42% (n=109) of men.
166 About 80.66% (n=171) had a severe CFTR genotype and 41 patients had a moderate one.
167 During this period, 39.62% (n=84) had an exacerbation and 25.94% (n=55) of the patients were
168 hospitalized (Table S1).

169 The 212 patients were classified following their chronic bronchial colonization in 3 different
170 groups: SA alone, PA alone and SA+PA. Co-infected patients were split into 2 subclasses

171 (competition and coexistence) regarding the SA-PA interaction state determined by agar
172 competition assay (Table 1). Among the 212 patients, 52.83% (n=112) had chronic bronchial
173 colonization with SA, 22.64% (n=48) with PA and 24.53% (n=52) with SA+PA. Within the 52
174 co-infected patients, 65.38% (n=34) of SA and PA isolates presented a coexistence interaction
175 and 34.62% (n=18) presented a competition phenotype. Patients solely colonized with PA were
176 older (average of 32.02y) than co-infected patients (average of 23.38y) and themselves older
177 than patients colonized by SA (average of 16.49y) (Table 1). This is consistent with the natural
178 history of infections and international values (4).

179
180 We proceeded to a FAMD analysis to decipher the similarity and heterogeneity between patient
181 groups using both continuous and categorical variables. The two first retained axes accounted
182 for 39.47% of the total variance of the data (Fig. S1). Four variables contributed to the first axe:
183 number of exacerbations, number and days of hospitalization and FEV1. Age, BMI and not
184 having pancreatic insufficiency contributed to the second axe. The repartition of the 212
185 patients based on the two first dimensions overlapped between the 4 groups (Fig. S1). Patients
186 infected by SA were the most represented group and appeared to have clinical variable values
187 more homogeneous than other patients. On the contrary, patients co-infected in a coexistence
188 state seemed to have values with a greater heterogeneity (Fig. S1).

189

190 **Impact of the co-infection on CF patient clinical outcome**

191 In order to define whether co-infection was associated with poorer clinical outcome, we
192 compared three groups: patients infected with SA, patients infected with PA and patients co-
193 infected with SA-PA. Continuous variable analysis differentiated the 3 patient groups (Table
194 2). SA patients seemed to be younger than co-infected patients, themselves younger than PA
195 patients ($p<0.0001$). SA group stood out from others by lower BMI values (PA vs SA:

196 $p < 0.0001$, SA+PA vs SA: $p = 0.0074$), a smaller number of hospitalizations (PA vs SA:
197 $p = 0.0017$, SA+PA vs SA: $p = 0.0013$), a reduced length of hospitalizations (PA vs SA:
198 $p = 0.0011$, SA+PA vs SA: $p = 0.0010$), a lower number of exacerbations ($p < 0.0001$) and an
199 higher FEV1 ($p < 0.0001$). Co-infected and PA groups were not statistically different for number
200 of hospitalizations, length of hospitalizations, number of exacerbations and FEV1. Only age
201 ($p = 0.0012$) and BMI ($p = 0.029$) values were significantly different. For the analysis of
202 categorical variables, CFRD was only statistically significant between PA versus SA mono-
203 infected group ($p = 0.0031$) and co-infected patients versus SA ($p = 0.0169$) (Table S2).

204 To further investigate these results and to consider potential association between variables,
205 multinomial analysis with infection type as outcome was performed using age, BMI, FEV1,
206 number of exacerbations, number of hospitalizations, length of hospitalizations and CFRD
207 (Table 3). Analyse through AIC criteria removed the three last characteristics suggesting that
208 number and length of hospitalizations and CFRD could not be associated with infection type.
209 The final model demonstrated that patients infected with PA were more likely to have a high
210 BMI [OR (95% CI): 1.2662 (1.0313, 1.5545)], a higher number of exacerbations; [OR (95%
211 CI): 2.0282 (1.2559, 3.2755)] and lower FEV1 [OR (95% CI): 0.9612 (0.9355, 0.9877)] relative
212 to patients infected with SA (Table 3). The results were similar when the co-infected group was
213 compared to SA only [OR (95% CI): BMI: 1.2022 (1.0015, 1.4432); exacerbations: 2.1660
214 (1.3514, 3.4078); FEV1: 0.9701 (0.9478, 0.9930)]. Comparing SA-PA group versus PA group,
215 only age criteria was significant as co-infected patients were more likely to be younger than
216 PA-mono-infected patients [OR (95% CI): 0.9477 (0.9017, 0.9961)].

217

218 **Impact of the bacterial coexistence and competition within co-infected CF patients**

219 The second objective of this study was to determine whether the interaction profile between SA
220 and PA could affect patient clinical outcome. Thus, we compared the mono-infected groups

221 (SA only and PA only) with two co-infected groups: SA plus PA in coexistence and SA plus
222 PA in competition.

223 Using continuous variables, the comparison between coexistence and competition groups
224 showed no significant difference (Fig. 1). No statistical differences were also found between
225 PA mono-infected and either SA plus PA in coexistence or in competition. Compared to SA
226 groups, both SA plus PA interaction groups seemed to infect older patients (Coex. vs SA.:
227 $p=0.0057$; Comp. vs SA: $p=0.0243$) with a higher number of exacerbations (Coex. vs SA:
228 $p<0.0001$; Comp. vs SA: $p=0.0003$) and lower values of FEV1 (Coex. vs SA: $p<0.0001$; Comp.
229 vs SA: $p=0.0001$). However, it is important to notice that, for BMI, number of hospitalization
230 and length of hospitalization criteria, only coexistence group is significantly different from SA
231 groups (Fig. 1). So, coexistence group presented higher values of BMI ($p=0.0449$), higher
232 number of hospitalizations ($p=0.0043$) and longer stay of hospitalizations ($p=0.0026$) compared
233 to SA groups.

234 Considering categorical variables, none characteristics were statically significant between the
235 two types of interaction (Table S3). However, comparing SA group, there was higher number
236 of CFRD patients in the coexistence group ($p=0.0164$); such criteria was not significant when
237 SA group was compared to competition group.

238 Finally, multinomial analysis was performed using all significant characteristics from
239 univariate tests. The final predictors retained after analyses of deviance through AIC criteria
240 were BMI, supply of food, number of exacerbations and FEV1. A significant difference was
241 found between the two types of interaction in co-infected patients. The coexistence state group
242 was more likely to need food supply than the competition group [OR (95% CI): 0.2262 (0.0536,
243 0.9541)] (Table 4). As univariate results, multivariate analyses confirmed that patients co-
244 infected by either a coexisting SA-PA pair, or a competition pair had higher odds of having
245 more exacerbations than those infected only by SA [OR (95% CI): 2.2896 (1.3982, 3.7494):

246 1.9090 (1.0956, 3.3262) respectively]. Compared to SA group, the competition state group
247 seemed to have lower values of FEV1 [OR (95% CI): 0.9589 (0.9300, 0.9887)] whereas the
248 coexistence state group were more likely to have higher BMI [OR (95% CI): 1.2047 (1.0210,
249 1.4213)].

250

251 **Diabetes outcome and infectious status are not associated**

252 Additional multivariate analyses were performed concerning CFRD patients due to statistically
253 significant difference between groups when performing univariate analyses (Table S2 and
254 Table S3). First of all, a multinomial analysis was conducted with the entire variables (including
255 the infection status) and taking CFRD as outcome. Through the analyses of deviance conducted
256 by AIC criteria, the following variables were excluded from the multinomial analysis: sex, BMI,
257 undernourishment, enteral nutrition, cirrhosis, length of hospitalisation, number of
258 exacerbations, FEV1 and type of infection. Thus, all these variables were not associated to
259 CFRD and CFRD patients were not more likely to be infected by neither SA nor PA nor
260 coinfecting by SA plus PA. Five characteristics were conserved in the final model where odds
261 ratios and associated adjusted p_values were reported (Table 5). CF-related diabetes patients
262 were more likely to be older [OR (95% CI): 1.1013 (1.0543, 1.1504)], to need more food supply
263 [OR (95% CI): 3.0259 (1.2297, 7.4459)] and were more hospitalized [OR (95% CI): 2.1662
264 (1.5254, 3.0763)].

265

266 **Discussion**

267

268 Lungs of CF patients are colonized by multiple bacteria and several studies were conducted to
269 decipher the impact of these colonisations on the clinical outcomes. We focused our study on
270 the two major pathogens responsible for chronic colonization: *Staphylococcus aureus* and

271 *Pseudomonas aeruginosa*. There is no gold standard to define chronic colonization especially
272 for SA. For PA infection, Leeds criteria (22) are sometimes used and define ‘chronic’ when
273 more than 50% of the preceding 12 months were PA culture positive. This definition requires
274 frequent expectoration sampling. Furthermore, these criteria may lack sensitivity and are not
275 always considered by clinicians (23). Alternatively, PA serology appears to be a sensitive
276 criterion to classify PA infection, especially in non-expectorating children but is not always
277 available (24). In order to clearly study the impact of SA and/or PA infection, we focused on
278 stabilized infections. Therefore, we considered chronic colonization when at least 3 samples
279 over a 9-month period had the same colonization pattern. These criteria are close to the
280 definition of European Consensus Criteria for PA colonisation. However, this stringent method
281 led to the exclusion of 33% of our cohort; 10% of patients were also excluded due to a change
282 in colonization status during the period studied. Finally, in our study, 52.83% of the remaining
283 patients had SA chronic colonization, 22.64% PA chronic colonization and 24.53% had chronic
284 co-colonization with both bacteria. These data are consistent with previous studies (5, 25).

285 The first point of our study was to compare the impact of chronic colonization by SA alone, PA
286 alone and SA plus PA on clinical outcome of CF patients. Indeed, being able to evaluate (or
287 even predict) the risks that a patient incurs depending on the type of bacterium and/or on
288 bacterial associations (in particular between PA and another pathogen) that colonize the lungs,
289 remains one of the major challenges in the management of patients. Thus, identifying patients
290 with harmful bacterial associations would be of clinical interest as they have increased risks of
291 worse clinical outcome. These bacterial association could become a therapeutic priority and
292 could be eradicated by targeting, for example, one of the pathogens. Conversely, we could
293 speculate that co-infection between PA and another bacterium represents a milder step in the
294 disease evolution, probably an intermediate stage between SA alone and PA alone.

295 In our study, we did not observe any differences regarding clinical status between patients co-
296 infected by PA and SA and those infected by PA alone. This suggests that the SA plus PA
297 combination does not lead to over- or under morbidity compared to the presence of PA alone
298 in the lungs and that there is no addition of the effects of the two pathogens. As soon as PA
299 colonise the CF lungs, whether SA is present or not, the clinical condition of the patients appears
300 to deteriorate. This agrees with the study by Ahlgreen *et al.* [12] but disagree with others [5,14-
301 17,22]. Indeed, studies on large size cohort with no distinction concerning age, suggested that
302 PA mono-infected group was the most severe [5,22] unlike studies on smaller cohort focus on
303 childhood concluded that co-infected group had the worst clinical outcomes [14,15,17]. In our
304 study, we did not focus on specific age class due to the limited size of the cohort. The sizes of
305 the cohorts and the age class studied could explain these dissimilarities and should be
306 considered to analyse CF clinical outcome.

307 Our results showed that SA chronic colonization conducted to a higher FEV1 (85.87 ± 22.39),
308 less exacerbations (0.25 ± 0.69), a smaller number of hospitalizations (15.18% of SA patients)
309 and shorter stay (8.00 ± 6.10) than SA plus PA co-infection or PA alone. This result confirms
310 previous studies (12) showing that SA infection alone is a marker of milder disease comparing
311 to PA, with less exacerbation rate and highest clinical score. Moreover, Hubert *et al.* (5) pointed
312 out that co-infection by methicillin-susceptible SA (MSSA) and PA was more severe (lower
313 FEV1 and higher IV antibiotic courses in one year) than mono-infection by MSSA. In the same
314 way, Cios *et al.* (25) found that only MSSA group was milder comparing to co-infection group.
315 Notably, association between SA alone and milder disease was not observed with MRSA.
316 Indeed, MRSA was associated with higher hospitalization rate and re-hospitalization compared
317 to co-infection. The SA methicillin resistant status seems to be, at the opposite, a severity
318 marker of SA infection in CF patients. In our cohort, only 15 MRSA cases were reported. This
319 low case number was not enough to perform analyses and conclude about impact of methicillin-

320 resistance status on clinical outcomes. Further studies are required to figure out why MRSA -
321 per se or as a surrogate marker of other genetic determinants- negatively impact the clinical
322 outcome of CF patients. Moreover, other features of SA strains, such as the toxins production,
323 could complement this analysis to more accurately describe the impact of SA in CF population.
324
325 CFRD is a severe complication of CF and association with bacterial infection could be used as
326 a predictive marker of severity. CFRD seemed to be overrepresented in mono-infected PA
327 (29.17%) and coinfecting (25%) patients and under-represented in mono-infected SA patients
328 (8.04%). CFRD represented 16.98% of our total patients and was slightly higher to CFRD rate
329 in European population (26). Limoli *et al.* (16) showed that CFRD status was marginally
330 associated, with an higher odds ratio, with co-infection by both SA and PA [OR (95% CI): 1.90
331 in comparison to SA or PA mono-infection(0,99, 3,6)]. We did not confirm this result. Indeed,
332 our multivariate analysis demonstrate that CFDR was associated to the age of the patients [OR
333 (95% CI): 1.1013 (1.0543, 1.1504)]. As co-infected and PA infected patients are older than SA
334 patients, CFDR could be more represented in the two first groups. However, we cannot exclude
335 that the difference between the two studies can be explained by a lower number of patients in
336 our study.

337
338 The second objective of the present study was to evaluate the impact of the type of interaction
339 between SA and PA (competition or coexistence) on clinical outcomes. Among the 52 patients
340 co-colonized with SA and PA, 65.38% of strain pairs were in coexistent interaction and 34.61%
341 in competition. These competitive and coexistence status were already described (6–8, 11, 27,
342 28). However, this is the first time that the type of interaction was evaluated in a large number
343 of clinical isolates and we described that coexistence is the predominant interaction type in
344 chronically co-colonized patients.

345 It has been accepted and described for a long time that PA could suppress SA growth by several
346 mechanisms (10). These data led to the theory that PA colonization causes SA elimination into
347 lungs patients. In fact, in our cohort, 24% of patients are co-colonized, which is consistent with
348 other studies (5, 16). Moreover, SA-PA pairs from co-infected patients were mostly coexisting.
349 Thus, our study shows that in 34 patients, chronic co-colonization may be due, at least in part,
350 to the inability of PA to suppress SA. It has been well described that, in CF lungs, PA strains
351 evolve and adapt from virulent early-infecting strains to less-virulent late-infecting strains (6,
352 8). Stresses induced by the pulmonary environment (oxidative and osmotic), antibiotic
353 treatments, immune system and other bacteria species, constitutes selective pressure forces for
354 adaptive mutations selection (8, 11, 17). Virulence changes could also reduce the antagonistic
355 action of the PA isolates on SA (7, 8). However, of all the factors affecting PA's evolution to
356 the pulmonary environment, the role of SA on PA evolution remains to be explored.

357 Nonetheless, in the present study, we did not observe a different age between patients colonized
358 with coexisting isolates (23.24 ± 10.52) and patients colonized with competitive pairs ($23.67 \pm$
359 8.98). This suggests that there would be no link between adapted late-infecting strains and
360 coexistence. In order to clarify this point, longitudinal studies will be necessary to evaluate the
361 link between bacteria interaction status and isolates evolution.

362 How PA tolerance towards SA may contribute to worst clinical outcome is a point that has not
363 been explored before. Except for food supply through multinomial analyses, no significant
364 difference in clinical outcomes between patient with coexisting pairs and patients with
365 competitive pairs was observed. Nevertheless, compared to SA group, patients infected by
366 competition pair were more likely to have lower FEV1 than those infected by coexisting pair.
367 These results may suggest that competition isolates may induce a more severe disease. Several
368 quorum sensing dependent virulence factors are produced by competition PA strains such as
369 rhamnolipids and phenazines (10), that could trigger an higher inflammatory response and a

370 lower FEV1. On the contrary, coexisting PA strains lacking the production of virulence factors
371 could less damage the lung environment. The clinical outcome is therefore mainly due to the
372 genotype/phenotype of PA. However, as described previously, the PA adaptation is related to
373 many environmental factors, including the surrounding bacteria. Thus, in the coexistence
374 context, a current analysis of SA impact on PA transcriptome and growth phenotype suggests
375 that SA could favour PA persistence (Camus et al., in preparation), and then influence the
376 clinical evolution. A larger patient cohort would be necessary to evaluate the real impact of
377 coexistence state on clinical outcomes. Coexistence between SA and PA may be an important
378 step of lung bacterial colonization in CF patient, and preventing this phenomenon could
379 participate in an adapted or even personalized management of CF patients.

380

381 **Ethical statement**

382 All methods were carried out in accordance with relevant French guidelines and
383 regulations. This study was submitted to the Ethics Committee of the Hospices Civils de Lyon
384 (HCL) and registered under CNIL No 17-216.

385

386 **Acknowledgments.**

387 “Vaincre la mucoviscidose” and “Gregory Lemarchal” associations supported this work. P
388 Briaud was supported by French Ministry of Education and Research and L Camus was
389 supported by Fondation pour la Recherche Médicale (grant number ECO20170637499). We
390 thank Marie Verneret for technical support.

391

392 **Authors’ contributions:**

393 PB, ADJ and KM contributed to conception and design of the study. PR, CM and FV
394 contributed to design of the study. PB and LC conducted the experiments. SB conducted and

395 analyzed all statistics. MB and ADJ collected the data. All authors contributed to manuscript

396 and approved the submitted version.

397 None of the authors have any conflict of interest to report.

398

399 **References:**

400

- 401 1. Debray D, Narkewicz M, Bodewes F, Colombo C, Housset C, Jonge H de, Jonker J, Kelly D, Ling
402 S, Poynard T, Sogni P, Trauner M, Witters P, Baumann U, Wilschanski M, Verkade H. 2017.
403 Cystic Fibrosis–related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives. *J Pediatr*
404 *Gastroenterol Nutr* 65:443–448.
- 405 2. Brennan AL, Beynon J. 2015. Clinical updates in cystic fibrosis-related diabetes. *Semin Respir Crit*
406 *Care Med* 36:236–250.
- 407 3. Davis PB. 2006. Cystic Fibrosis Since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173:475–482.
- 408 4. Zolin, Orenti, Naehrlich, van Rens. 2019. ECFS Patient Registry Annual Data Report 2017.
- 409 5. Hubert D, Réglier-Poupet H, Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Le Bourgeois M, Burgel P-R, Serreau
410 R, Dusser D, Poyart C, Coste J. 2013. Association between *Staphylococcus aureus* alone or
411 combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis.
412 *J Cyst Fibros* 12:497–503.
- 413 6. Limoli DH, Whitfield GB, Kitao T, Ivey ML, Davis MR, Grahl N, Hogan DA, Rahme LG, Howell
414 PL, O’Toole GA, Goldberg JB. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction
415 Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory
416 Infection. *mBio* 8:e00186-17.
- 417 7. Baldan R, Cigana C, Testa F, Bianconi I, De Simone M, Pellin D, Di Serio C, Bragonzi A, Cirillo
418 DM. 2014. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences
419 Virulence of *Staphylococcus aureus* In Vitro and Murine Models of Co-Infection. *PLoS ONE*
420 9:e89614.

- 421 8. Michelsen CF, Christensen A-MJ, Bojer MS, Hoiby N, Ingmer H, Jelsbak L. 2014. *Staphylococcus*
422 *aureus* Alters Growth Activity, Autolysis, and Antibiotic Tolerance in a Human Host-Adapted
423 *Pseudomonas aeruginosa* Lineage. *J Bacteriol* 196:3903–3911.
- 424 9. Michelsen CF, Khademi SMH, Johansen HK, Ingmer H, Dorrestein PC, Jelsbak L. 2016. Evolution
425 of metabolic divergence in *Pseudomonas aeruginosa* during long-term infection facilitates a proto-
426 cooperative interspecies interaction. *ISME J* 10:1323–1336.
- 427 10. Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2017. In vivo and In vitro
428 Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front Cell Infect*
429 *Microbiol* 7.
- 430 11. Tognon M, Köhler T, Gdaniec BG, Hao Y, Lam JS, Beaume M, Luscher A, Buckling A, van Delden
431 C. 2017. Co-evolution with *Staphylococcus aureus* leads to lipopolysaccharide alterations in
432 *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J*.
- 433 12. Ahlgren HG, Benedetti A, Landry JS, Bernier J, Matouk E, Radzioch D, Lands LC, Rousseau S,
434 Nguyen D. 2015. Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas*
435 *aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med* 15:67.
- 436 13. Cios K, Cohen B, Quittell LM, Liu J, Larson EL. 2019. Impact of colonizing organism in the
437 respiratory tract on the incidence, duration, and time between subsequent hospitalizations among
438 patients with cystic fibrosis. *Am J Infect Control* 47:750–754.
- 439 14. Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, Ramsey BW. 2009. Impact
440 of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* Infection on Inflammation and Clinical Status in Young
441 Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 154:183-188.e3.
- 442 15. Gangell C, Gard S, Douglas T, Park J, de Klerk N, Keil T, Brennan S, Ranganathan S, Robins-
443 Browne R, Sly PD, AREST CF. 2011. Inflammatory responses to individual microorganisms in
444 the lungs of children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 53:425–432.

- 445 16. Limoli DH, Yang J, Khansaheb MK, Helfman B, Peng L, Stecenko AA, Goldberg JB. 2016.
446 Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa co-infection is associated with cystic
447 fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:947–953.
- 448 17. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. 1993. Prognostic implications of initial oropharyngeal
449 bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr*
450 122:854–860.
- 451 18. Welsh MJ, Smith AE. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic
452 fibrosis. *Cell* 73:1251–1254.
- 453 19. William Venables. 2016. nnet: Feed-Forward Neural Networks and Multinomial Log-Linear
454 Models.
- 455 20. Akaike H. 1998. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle, p.
456 199–213. *In* Parzen, E, Tanabe, K, Kitagawa, G (eds.), *Selected Papers of Hirotugu Akaike*.
457 Springer New York, New York, NY.
- 458 21. R Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for
459 Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 460 22. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. 2003. Evaluation of a new
461 definition for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*
462 2:29–34.
- 463 23. Hoo ZH, Edenborough FP, Curley R, Prtak L, Dewar J, Allenby MI, Nightingale JA, Wildman MJ.
464 2018. Understanding Pseudomonas status among adults with cystic fibrosis: a real-world
465 comparison of the Leeds criteria against clinicians’ decision. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
466 37:735–743.
- 467 24. Taccetti G, Denton M, Hayes K, Drevinek P, Sermet-Gaudelus I, Bilton D, Campana S, Dolce D,
468 Ferroni A, Héry-Arnaud G, Martin-Gomez M-T, Nash E, Pereira L, Pressler T, Tümmler B. 2019.

469 A critical review of definitions used to describe *Pseudomonas aeruginosa* microbiological status
470 in patients with cystic fibrosis for application in clinical trials. *J Cyst Fibros* S1569199319308677.

471 25. Cios K, Cohen B, Quittell LM, Liu J, Larson EL. 2019. Impact of colonizing organism in the
472 respiratory tract on the incidence, duration, and time between subsequent hospitalizations among
473 patients with cystic fibrosis. *Am J Infect Control* 47:750–754.

474 26. Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziaorou E, Ellemunter H, Drevinek P, Gulmans V,
475 Krivec U, Olesen H. 2014. Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the
476 ECFS Patient Registry. *Eur Respir J* 43:125–133.

477 27. Cigana C, Bianconi I, Baldan R, De Simone M, Riva C, Sipione B, Rossi G, Cirillo DM, Bragonzi
478 A. 2017. *Staphylococcus aureus* impacts *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory disease in
479 murine models. *J Infect Dis*.

480 28. Briaud P, Camus L, Bastien S, Doléans-Jordheim A, Vandenesch F, Moreau K. 2019. Coexistence
481 with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance
482 and internalization into epithelial cells. *Sci Rep* 9:1–14.

483

484

485

486 Table 1: Clinical characteristics of CF patients according to their bacteriological status

487

	SA alone	PA alone	SA and PA			
	(%)	(%)	competition	coexistence	merge	p_value*
Number	112/212	48/212	18/52 (34.61)	34/52 (65.38)	52/212	
Age (years)	16.49 ± 8.77	32.02 ±	23.67 ± 8.98	23.24 ± 10.52	23.38 ±	<0.0001 ^a
≥18 years	45/112	42/48	14/18	23/34	37/52	
Sex, male	63/112	23/48	10/18	13/34	23/52	ns
Genotype						
Moderate	26/112	9/48	3/18	3/34	6/52	ns
Severe	86/112	39/48	15/18	31/34	46/52	
BMI (kg/m ²)	18.06 ± 2.68	20.74 ± 2.42	19.25 ± 2.56	19.71 ± 3.56	19.55 ±	<0.0001 ^a
Undernourishment	11/112	1/48	1/18	3/34	4/52	ns
Food supply	23/112	13/48	3/18	15/34	18/52	ns
Enteral nutrition	4/112	0/48	0/18	4/34	4/52	ns
Pancreatic	101/112	45/48	17/18	33/34	50/52	ns
CF-related diabetes	9/112	14/48	3/18	10/34	13/52	0.0007 ^b
Cirrhosis	6/112	2/48	0/18	1/34	1/52	ns
Hospitalizations during						
Number	17/112	18/48	6/18	14/34	20/52	0.0003 ^a
Length	8.00 ± 6.10	17.39 ±	7.33 ± 6.12	29.14 ± 27.39	22.60 ±	0.0002 ^a
Number of	0.25 ± 0.69	1.44 ± 1.37	1.28 ±	1.35 ±	1.33 ±	<0.0001 ^a
FEV1(% predicted)	85.87 ±	55.09 ±	59.72 ± 18.73	64.59 ± 21.79	62.90 ±	<0.0001 ^a

488 BMI: Body Mass Index

489 FEV1: Forced Expiratory Volume in one second

490 * P values from comparison between three groups: SA vs PA vs SA+PA (merge).

491 ^a P values from Kruskal-Wallis non-parametric test for comparison of the three groups (continuous
492 variables)

493 ^b P values from Fisher's exact test for comparison of the three groups (categorical variables)

494

495 Table 2: P-values for continuous variables comparisons between SA mono-infected (SA), PA
496 mono-infected (PA) and co-infected groups (SA+PA). Mann-Whitney Wilcoxon non-
497 parametric test corrected by a Bonferroni method was used.

498

	PA vs SA	SA+ PA vs SA	SA+PA vs PA
Age	<0.0001	<0.0001	0.0012
BMI	<0.0001	0.0074	0.029
Number of hospitalizations	0.0017	0.0013	ns
Length of hospitalization	0.0011	0.0010	ns
Number of exacerbations	<0.0001	<0.0001	ns
FEV1	<0.0001	<0.0001	ns

499

500

501 Table 3: Adjusted odds ratios of cystic fibrosis patients' infection status. Multinomial
 502 regression analyses were performed to study associations between the type of infection (SA
 503 mono-infected (SA), PA mono-infected (PA) and co-infected groups (SA+PA)) and clinical
 504 outcomes. Adjusted odds ratios with 95% confidence intervals (CI) are mentioned.
 505

	PA vs SA		SA+ PA vs SA		SA+PA vs PA	
	OR (95 % CI)	p_value	OR (95 % CI)	p_value	OR (95 % CI)	p_value
Age	-	0.1354	-	0.6767	0.9477 (0.9017, 0.9961)	0.0345
BMI	1.2662 (1.0313, 1.5545)	0.0242	1.2022 (1.0015, 1.4432)	0.0481	-	0.5913
Number of exacerbations	2.0282 (1.2559, 3.2755)	0.0038	2.1460 (1.3514, 3.4078)	0.0012	-	0.7298
FEV1	0.9612 (0.9355, 0.9877)	0.0043	0.9701 (0.9478, 0.9930)	0.0108	-	0.4947

506

507

508

509 Table 4: Adjusted odds ratios of cystic fibrosis patients' infection status. Multinomial
 510 regression analyses were performed to study associations between the type of infection (SA
 511 mono-infected (SA), PA mono-infected (PA) and co-infected groups in coexistence state
 512 (Coex.), or in competition state (Comp.)) and clinical outcomes. Adjusted odds ratios with 95%
 513 confidence intervals (CI) are mentioned.
 514

	Coex vs SA		Comp vs SA		Comp Vs Coex	
	OR (95 % CI)	p_value	OR (95 % CI)	p_value	OR (95 % CI)	p_value
BMI	1.2047 (1.0210, 1.4213)	0.0273	-	0.3199	-	0.4872
Food supply	-	0.0801	-	0.3609	0.2262 (0.0536, 0.9541)	0.0430
Number of exacerbations	2.2896 (1.3982, 3.7494)	0.0010	1.9090 (1.0956, 3.3262)	0.0228	-	0.4472
FEV1	-	0.0861	0.9589 (0.9300, 0.9887)	0.0072	-	0.1885

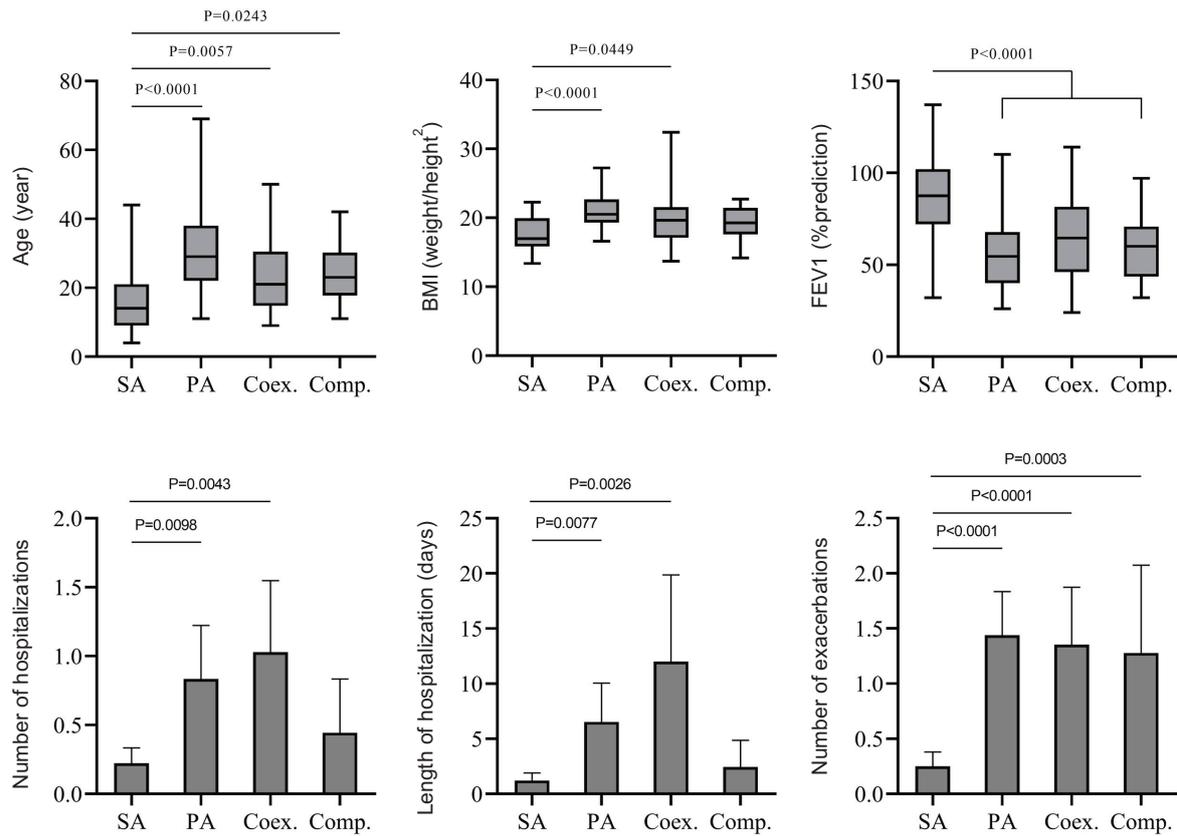
515

516

517 Table 5: Adjusted odds ratios of cystic fibrosis-related diabetes (CFRD) patients' infection
518 status. Multinomial regression analyses were performed to study associations between cystic
519 fibrosis-related diabetes (CFRD) and other clinical outcomes including infection type. Adjusted
520 odds ratios with 95% confidence intervals (CI) are mentioned.

	OR (95 % CI)	p_value
Age	1.1013 (1.0543, 1.1504)	<0.0001
Genotype	-	0.1022
Food supply	3.0259 (1.2297, 7.4459)	0.0160
Pancreatic insufficiency	-	0.8192
Number of hospitalizations	2.1662 (1.5254, 3.0763)	<0.0001

532
533
534
535
536
537
538



539

540 Fig 1: Comparison between SA mono-infected (SA), PA mono-infected (PA) and co-infected
541 groups in competition (Comp) or in coexistence (Coex). Mann-Whitney Wilcoxon non-
542 parametric test corrected by a Bonferroni method was used

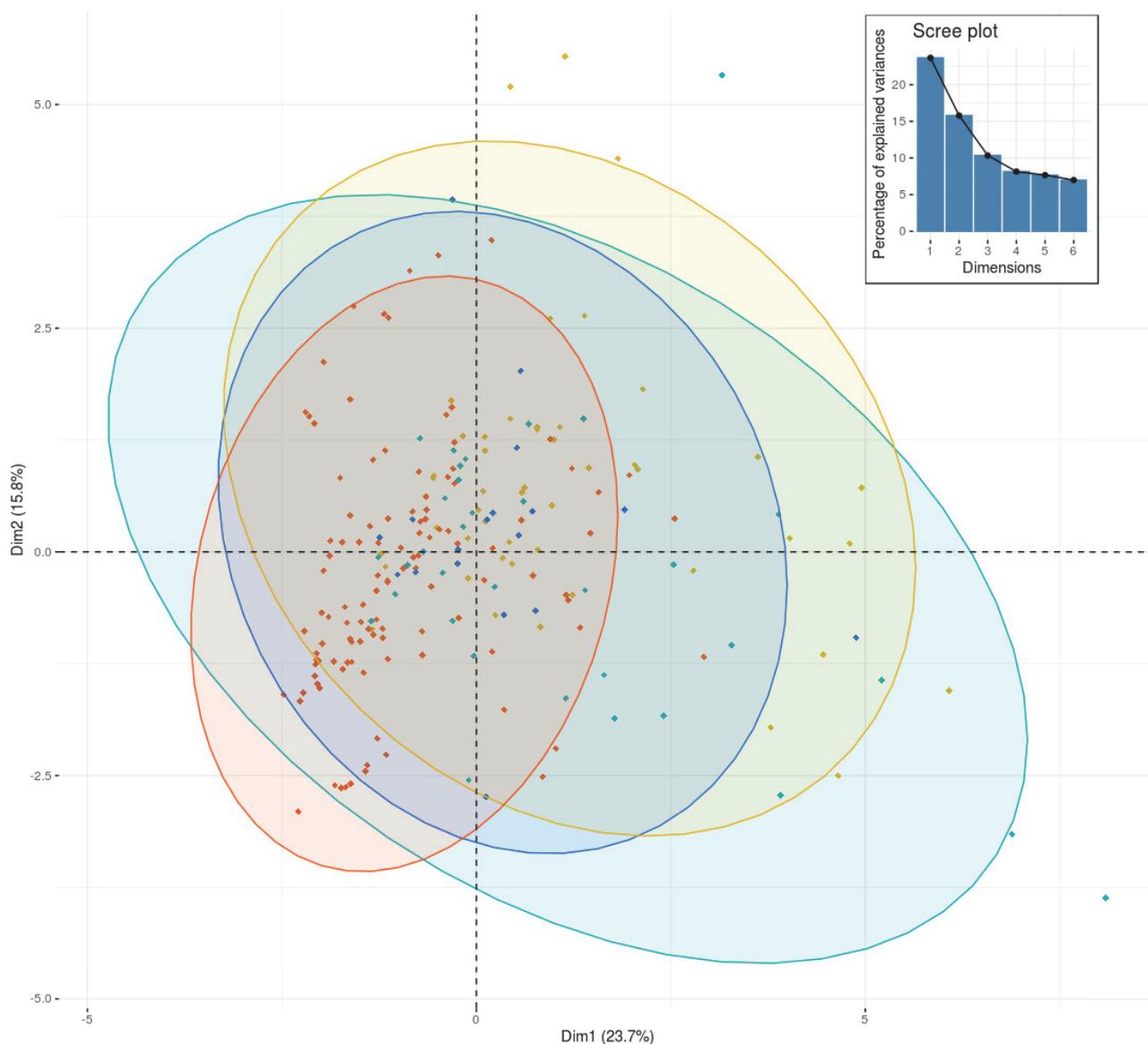
543

544 **Supplementary data**

545

546

547



548 Fig. S1: Individual factor map from FAMD based on 212 patients using the two first principal
549 components. Patients are colored according to their infection type, SA mono-infected (red), PA
550 mono-infected (yellow), SA+PA coinfection in a competition state (blue), SA+PA coinfection
551 in a coexistence state (cyan). Associated eigenvalue plot is shown at the top right.

552

553 Table S1: Patients characteristics at the time of the study

Baseline characteristics	Numbers of patients	Mean \pm SD or Percentage
Age (years)	212	21.70 \pm 12.09
≥ 18 years	124/212	58.49%
Sex, male	109/212	51.42%
Genotype		
Moderate	41/212	19.34%
Severe	171/212	80.66%
BMI (kg/m ²)	212	19.03 \pm 2.97
Undernourishment	16/212	7.55%
Food supply	54/212	25.47%
Enteral nutrition	8/212	3.77%
Pancreatic sufficiency	16/212	7.55%
CF-related diabetes	36/212	16.98%
Cirrhosis	9/212	4.25%
Hospitalizations during study period	55/212	25.94%
Number		1.96 \pm 1.17
Length (days)		16.38 \pm 18.28
Exacerbations*	84	0.78 \pm 1.24
FEV1 (% predicted)	212	73.27 \pm 25.12

554 BMI: body mass index

555 FEV1: forced expiratory volume in one second

556 * Corresponding to total number of exacerbations

557 Table S2: P-values for categorical variables comparisons between *S. aureus* mono-infected
558 (SA), *P. aeruginosa* mono-infected (PA) and co-infected groups (SA+PA). Fisher's exact test
559 corrected with a Bonferroni method was used.

560

561

	PA vs SA	SA+ PA vs SA	SA+PA vs PA
Sex	-	-	-
Genotype	-	-	-
Undernourishment	-	-	-
Food supply	-	-	-
Enteral nutrition	-	-	-
Pancreatic sufficiency	-	-	-
CF-related diabetes	0.0031	0.0169	ns
Liver cirrhosis	-	-	-

562

563

564

565 Table S3: P-values for categorical variables comparisons between *S. aureus* mono-infected
 566 (SA), *P. aeruginosa* mono-infected (PA), co-infected in a coexistence (Coex) state and co-
 567 infected in a competition (Comp) state group.

568

	Coex vs SA	Comp vs SA	Coex vs PA	Comp vs PA	Comp. vs Coex
Sex	-	-	-	-	-
Genotype	-	-	-	-	-
Undernourishment	-	-	-	-	-
Food supply	ns	ns	ns	ns	ns
Enteral nutrition	-	-	-	-	-
Pancreatic insufficiency	-	-	-	-	-
CF-related diabetes	0.0164	ns	ns	ns	ns
Liver cirrhosis	-	-	-	-	-

569

570

Résultats expérimentaux

Les gènes essentiels de *Staphylococcus aureus* nécessaires à la coexistence avec *Pseudomonas aeruginosa*

Résultats non publiés

Paul Briaud, Bastien Sylvère, Laura Camus, François Vandenesch, and Moreau Karen

Résultats expérimentaux

Introduction

L'identification des gènes essentiels dans la relation de coexistence permet de montrer les déterminants génétiques chez *S. aureus* importants pour son maintien en présence de *P. aeruginosa*. Même s'il est vrai que les interactions semblent gouvernées par *P. aeruginosa*, *S. aureus* doit répondre à son partenaire en adaptant son métabolisme, sa virulence et son fitness. Les banques de transposons sont des outils puissants pour sonder la physiologie bactérienne. Associées au séquençage à haut débit (NGS), des banques de transposon ont déjà été utilisées pour caractériser les gènes essentiels, dans de nombreuses conditions et espèces bactériennes différentes (van Opijnen and Camilli, 2013). L'approche par transposon-sequencing utilisée ici a été acquise lors d'un séjour de deux mois à l'Imperial College de Londres, au « Center for Molecular Bacteriology and Infection » dans le groupe du Pr. Angelika Gründling. Elle reprend la méthode développée par l'équipe de Timothy C. Meredith à Harvard (Santiago et al., 2015), se basant par l'apport du transposon HIMAR dans *S. aureus* par transduction phagique. Des souches de *S. aureus* codant une transposase plasmidique sont transduites à l'aide d'une suspension phagique portant le transposon. La transposase va reconnaître le transposon au niveau de ces sites ITR situés aux extrémités. L'insertion aléatoire de ce transposon dans le génome au niveau d'un dinucléotide TA peut inactiver le gène au niveau du site d'insertion. Chaque événement ne se produisant qu'une fois, chaque individu de la population a une insertion unique d'un transposon. L'ensemble de cette population hétérogène est appelé banque de transposons et sera ensuite soumis à une pression de sélection (antibiotiques, température...), qui éliminera les individus de la population impactés dans un gène essentiel à cette pression de sélection (Figure III-1). L'identification des régions d'insertion du transposon est possible grâce à la présence d'un site enzymatique MmeI à l'extrémité 5' du transposon. La digestion par cette enzyme permet de libérer une portion de 16 nucléotides de l'ADNg bactérien. Après séquençage à haut débit de l'ensemble de ces portions d'ADN, un alignement sur un génome de référence permet de révéler la position de l'insertion de chaque transposon au sein de la population (Figure III-1). En comparant la densité d'insertion de transposon avant et après la pression de sélection, on en est mesure de révéler les gènes essentiels à une pression de sélection précise. Dans notre étude, la première étape a donc été de construire ces banques de transposon. Deux souches ont été sélectionnées, la souche clinique isolée de patient CF SA31 et la souche de référence HGO03, et ont permis d'obtenir des

Résultats expérimentaux

banques avec un haut niveau de saturation des sites d'insertion du transposon. Des cocultures avec *P. aeruginosa* PA69 et PA2600 ont été réalisées sur 36h avec des dilutions dans du milieu riche (BHI ; Brain Heart Infusion) toute les 12h pour conserver une pression suffisante à la sélection des mutants. Après préparation des bibliothèques de séquençage et le NGS, l'analyse informatique a été réalisée par Sylvère Bastien, bio-informaticien de l'équipe. Les résultats montrent que les grands systèmes de régulation de gène de *S. aureus* sont nécessaires à la coexistence avec *P. aeruginosa* (*agr*, *sigB*, *AlrR*, *sarR*) ainsi que les gènes impliqués dans la répression catabolique *ccpA*, métabolisme des acides aminés et des nucléotides à base purine (AMP/GMP).

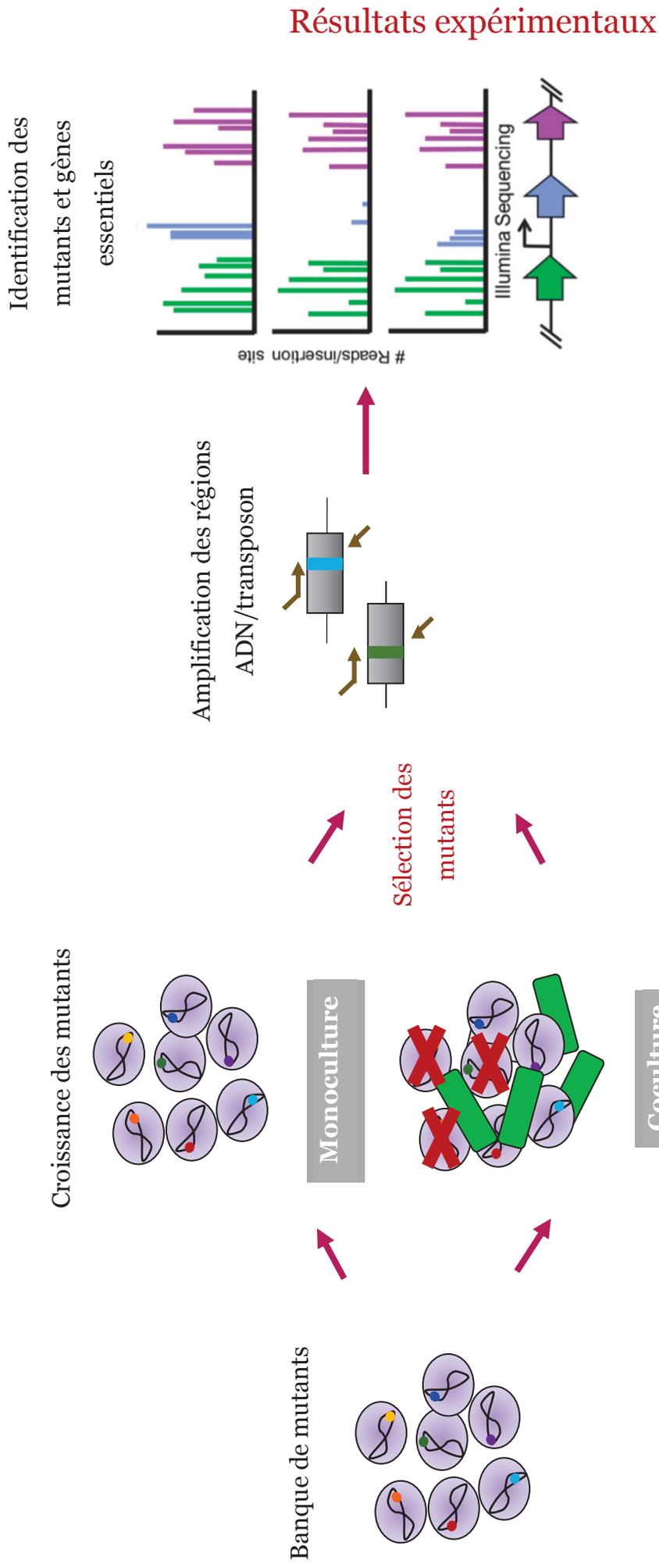


Figure III-1 : Principe du transposon sequencing. La banque de mutants préalablement construite est soumise à une pression de sélection (coculture avec *P. aeruginosa*). Cette coculture permet de contre-sélectionner uniquement les clones de *S. aureus* non-impacts dans un gène essentiel à cette pression de sélection. Après une amplification des régions ADN/transposon et séquençage, l'identification des gènes est permise en comparant la densité d'insertion du transposon à la culture contrôle (monoculture).

Résultats expérimentaux

Matériels et méthodes

Souches bactériennes et plasmides.

Les souches bactériennes, la souche de phage et les plasmides utilisés pendant cette étude sont listés dans le **Tableau III-1**. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu Tryptic-soy broth (TSB- BD®) ou BHI (BD®) à 37°C ou 30°C avec agitation à 200 rotations par minute (rpm).

Le plasmide pTM239 possède :

- (i) Une gène codant une protéine d'initiation de la réplication RepC inactive permettant sa réplication uniquement dans des souches exprimant en *trans* une protéine RepC.
- (ii) Une région homologue à l'ADN du phage $\Phi 11$ pour augmenter la probabilité d'encapsider ce plasmide par le phage.
- (iii) Le transposon HIMAR comportant un gène de résistance à l'érythromycine avec un terminateur pour arrêter sa transcription et empêcher la transcription de gènes voisins lors de son insertion dans le génome (Wang et al., 2011). Le transposon possède deux séquences de digestion NotI et MmeI. La première permet de libérer en 3' le transposon du génome bactérien et le second, permet de récupérer après digestion la jonction transposon/ADN de 16nt important pour visualiser après séquençage l'insertion du transposon dans le génome. L'incorporation d'un adapter P7 Illumina a été effectuée pour permettre un séquençage (NGS) (Santiago et al., 2015).

Les plasmides pTM231 et pTM232 codent respectivement pour une transposase et une transposase tronquée. Ce dernier est utilisé pour estimer l'insertion spontanée du transposon dans la bactérie n'exprimant pas la transposase. De plus, sur les deux plasmides on retrouve : (i) le gène *orf5* dont le produit inhibe la réplication du phage $\Phi 11$ et par conséquent inhibe son cycle lytique, et (ii) un marqueur de résistance à la kanamycine permettant la sélection des souches transformées.

Le phage $\Phi 11$:: FRT utilisé ici a été modifié à partir du phage $\Phi 11$ sauvage en remplaçant le site d'intégration *attP* du phage par le site FRT d'une levure pour empêcher son intégration dans le génome bactérien (Santiago et al., 2015). Ainsi

Résultats expérimentaux

Tableau III-1 : Souches, plasmides et phage utilisés dans cette étude

Bactéries	Génotypes/Phénotypes	Références
LUG8 RN4220	<i>S. aureus</i> subsp. aureus NCTC8325 MSSA; r- m+; partial agr defect	Novick et al., 1983
TM239	RN4220+pTM239	Santiago et al., 2015
TM19	RN4220 Orf5+, Δattb, tetR	Wang et al., 2011
LUG2961 HG003	<i>S. aureus</i> subsp. aureus NCTC8325 MMSA; Ø11 Ø12 Ø13, r+, m+, agr+, rsbu+, tcar+	Herbert et al., 2010
SA31	<i>S. aureus</i> clinique de patients CF, agrII, CC15, MSSA	Cette étude
TM231	HG003 Ø11::FRT + pTM231	Santiago et al., 2015
PA2600	<i>P. aeruginosa</i> issue de patient CF	Briaud et al., 2019
PA69	<i>P. aeruginosa</i> issue de patient CF	Briaud et al., 2019
TM232	HG003 Ø11::FRT + pTM232	Santiago et al., 2015
LUG21 NCTC8325-4	<i>S. aureus</i> subsp. aureus NCTC8325 MMSA; ΔØ11 ΔØ12 ΔØ13, r+, m+, agr+, rsbu-, tcar-	Novick et al., 1967
Phages		
Ø11::FRT	Ø11 int-, attP-	Santiago et al., 2015
Plasmides		
pTM239(blunt)	pTM402 modified with NotI-P7 annealing site ITR2::MmeI-NotI with DNA barcode (gGTAA) - ermR	Santiago et al., 2015
pTM231	pWVO1ts ori aphA-3 Gram+ RBS HMAR1 C9 transposase; KmR	Santiago et al., 2015
pTM232	pWVO1ts ori aphA-3 Gram+ RBS ΔHMAR1 C9 truncated transposase; KmR	Santiago et al., 2015

Résultats expérimentaux

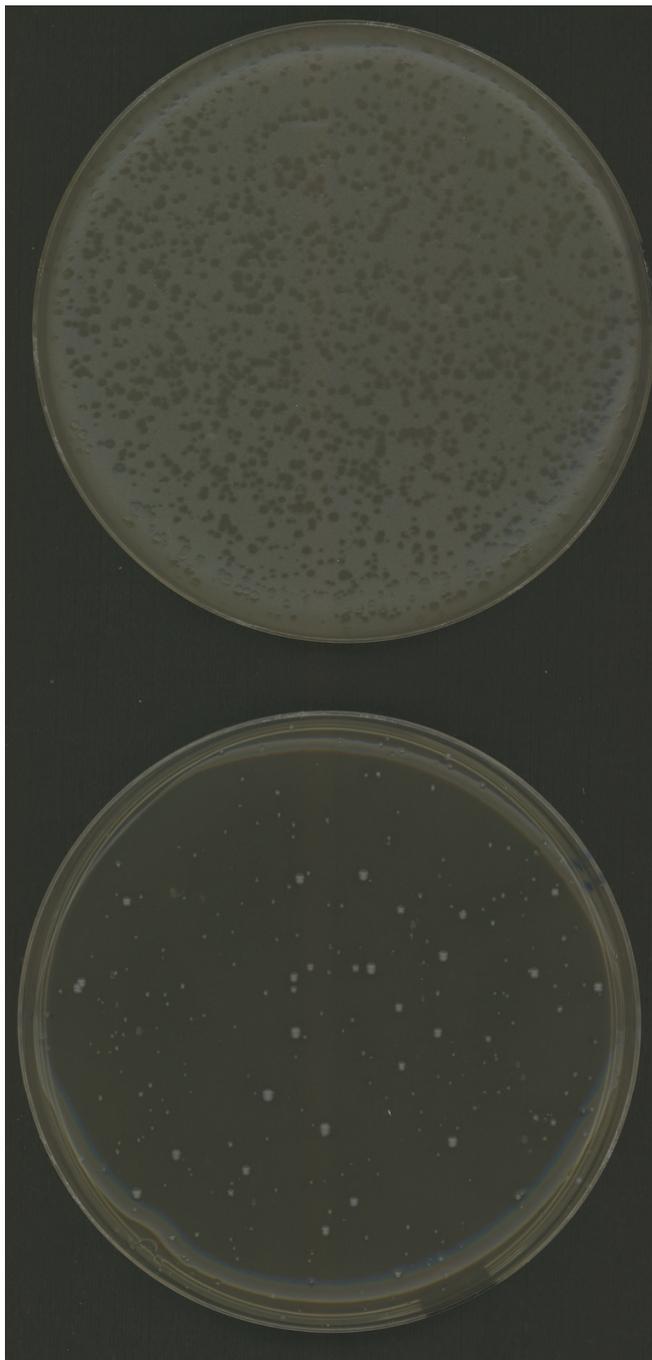
le phage Φ_{11} :: FRT est utilisé uniquement comme transporteur du plasmide pTM239 dans les souches codant les transposases.

Production de phage portant le plasmide pTM239 et titration.

La souche TM239, porteuse du plasmide pTM239, a été cultivée dans 5mL de TSB (érythromycine 5 μ g/mL) jusqu'à une absorbance de $DO_{600nm} = 0,1$. Cent microlitres de 10^4 à 10^5 UFP/mL (Unité Formant de Plage de lyse) de phage Φ_{11} :: FRT (donné par Pr. Angelika Gründling) ont été ajoutés à 500 μ l de suspension bactérienne TM239. Cette mixture a été mélangée dans 5mL de top agar (TSB 0,7% d'agar + de 7,5mM CaCl₂) en surfusion et déposée sur le bottom agar (TSA + 10mM CaCl₂). Après un temps d'incubation à 37°C sur la nuit, la présence de nombreuses plages de lyses confirment la production de phages. Dix millilitres de TSB ont été déposés sur le top agar et laissés à incuber jusqu'au lendemain sous agitation à 50rpm à température ambiante. La suspension phagique a ensuite été récupérée, centrifugée à 4000rpm pendant 15min, purifiée sur filtre de 0,22 μ m et conservée à 4°C.

Pour titrer la suspension phagique, les souches TM19 et LUG8 (Tableau III-1) sont utilisées. La titration s'effectue en deux étapes : (i) la concentration totale de phages produits précédemment est estimée en infectant la souche LUG8 et en comptant le nombre de plage de lyse (Figure III-2) (ii) la concentration de phage ayant encapsidé le plasmide pTM239 est estimée en comptant le nombre de colonie TM19 devenue résistance à l'érythromycine (Figure III-2). En effet, cette souche possède le gène *Orf5* cI-like et le gène *attB* délété qui empêche la réplication et l'intégration du phage. L'infection par le phage Φ_{11} :: FRT apporte uniquement le plasmide codant le transposon (portant la résistance à l'érythromycine). En étalant la suspension bactérienne TM19 infectée par Φ_{11} :: FRT sur gélose avec antibiotiques, le comptage du nombre de colonie ermR indique la quantité de phage possédant le plasmide pTM239. Les souches RN4220 et TM19 ont été cultivées en milieu TSB jusqu'à $DO_{600nm}=0,1$ à 37°C et 30°C respectivement en présence de tétracycline à 2,5 μ g/mL pour TM19. La suspension phagique a été diluée jusqu'à 10^{-7} dans du TSB et chaque dilution a été ajoutée (100 μ L) aux suspensions bactériennes précédentes (500 μ L). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les mélanges réactionnels ont été ajoutés dans 5mL de top agar (TSB 0,7% d'agar + de 7,5mM CaCl₂) en surfusion et déposés sur le bottom agar (TSA + 10mM CaCl₂). Les géloses ont été

Résultats expérimentaux



LUG8 + Ø11::FRT

TM19 + Ø11::FRT

Figure III-2 : Estimation du nombre de phage encapsidant le transposon. Les souches LUG8 et TM19 ont été infectées par le phage Ø11 :: FRT et ensuite étalées sur géloses top et bottom agar additionnées d'érythromycine à 10µg/mL pour TM19. Le nombre de plage de lyse de la souche LUG8 indique la concentration totale de phage tandis que le nombre de colonie acquérant la résistance à l'érythromycine indique le nombre de bactérie infecté par un phage ayant encapsidé le transposon.

Résultats expérimentaux

incubées à 37°C sur la nuit. Le pourcentage de phages ayant encapsidé le transposon se calcule de la façon suivante :

$$\% \text{ phages} + Tn = \frac{\text{nombre UFC TM19}}{\text{Nombre UFC TM19} + \text{Nombre UFP RN4220}} * 100$$

Le taux d'encapsidation est alors estimé à 25% (Figure III-2).

Construction des banques de mutants

Les souches HG003 et SA31 (sensibles à la kanamycine et à l'érythromycine) ont été sélectionnées pour construire les banques de mutants car possédant une très bonne sensibilité pour le phage $\Phi 11 :: \text{FRT}$ (testé préalablement). Elles ont été transformées par électroporation avec les plasmides pTM231 codant pour la transposase et pTM232 codant pour la transposase tronquée (témoin négatif). Les souches obtenues ont été cultivées dans 25mL de TSB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine à 30°C sous agitation à 200rpm jusqu'à atteindre une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$. Ensuite, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 25mL de milieu SGMM (10mM D+ glucose (Sigma-Aldrich®), 2mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich®), 3,5mM CaCl_2 (Sigma Life Science®), 0,1% CAS amino-acids (Fisher®), 0,5% NaCl (Sigma-Aldrich®), 10mM MES (Amresco®), pH= 6,8). Cinq millilitres de solution phagique ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 15min sous agitation (50rpm) à température ambiante, puis 2h à 30°C sans agitation. Le mélange réactionnel a été centrifugé et lavé 3 fois dans 30mL de TSB puis incubé 1h30 à 30°C avec agitation (200rpm). Après avoir récolté les cellules dans 6mL de TSB + érythromycine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 μL de cette suspension ont été étalés de manière répétée sur des géloses TSA + érythromycine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de diamètre 145mm puis incubées pendant 2j à 30°C. En parallèle, des dilutions successives ont été étalées sur gélose TSA + érythromycine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour pouvoir estimer la taille de la banque.

Après s'être assuré qu'aucune colonie n'ait poussée pour la construction pTM232 (transposase tronquée), les colonies présentes sur toutes les géloses ont été récoltées à l'aide d'un râteau en une seule fois et resuspendues dans 200mL de TSB + érythromycine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Trois étapes de lavages en milieu TSB ont suivi en centrifugeant la suspension à 7000rpm pendant 25min à température ambiante. A la fin, les bactéries ont été resuspendues dans 60mL TSB + 12,5% glycérol, aliquotées en

Résultats expérimentaux

cryotube et plongées dans de l'azote liquide pour les congeler instantanément. Les aliquots ont été conservés à -80°C.

Coculture avec *Pseudomonas aeruginosa*.

Les souches PA2600 et PA69 ont été choisies pour réaliser les cocultures avec les deux banques précédemment construites HG003 et SA31. Des cultures sur la nuit des souches de *P. aeruginosa* ont été réalisées dans 10mL de BHI à 37°C sous agitation puis diluées à DO600nm = 0,2 dans 50mL de BHI. Deux aliquots des deux banques ont été décongelés et dilués au 1/1000 dans 50mL de BHI. Les dilutions ont été incubées pendant 4h à 37°C, 200rpm pour permettre une croissance bactérienne. Les monocultures ont été réalisées en ajoutant 10mL de suspension de *S. aureus* à DO600nm= 0,1 à 10mL de BHI tandis que les cocultures ont été réalisées en ajoutant 10mL de ces suspensions de *S. aureus* à 10mL de suspension de *P. aeruginosa* à DO600nm= 0,1.). Les suspensions ont été incubées à 37°C, 200rpm pendant 36h avec une dilution dans du BHI frais à DO=0,1 toutes les 12h afin de maintenir la croissance bactérienne. Les bactéries ont été étalées toutes les 12h sur géloses sélectives (MSA : Mannitol Salt Agar, pour *S. aureus* et cétrimide pour *P. aeruginosa*) afin de vérifier la concentration bactérienne. Trois millilitres de chaque culture ont été récoltés à 36h de l'expérience et conservés à -20°C avant l'étape d'extraction et de préparation de l'ADN.

Préparation des bibliothèques de séquençage.

Les culots précédents ont été utilisés pour extraire et préparer l'ADN pour le séquençage à haut débit. Les bactéries ont été resuspendues dans 100µL de tampon P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) supplémenté de 100µg/mL de RNaseA et de 15µL de lysostaphine à 2mg/mL et incubées pendant 30min à 37°C. Le lysat bactérien a été resuspendu dans 500µL de tampon GES (0,5M thyocyanate de guanidium, 0,5M EDTA pH8, 0,1% sarkosyl, Sigma-Aldrich®). Deux cents cinquante microlitres de NH₄ acétylé (7,5M) ont été ajoutés. Après 10 minutes d'incubation dans la glace, l'ADN est extrait au chloroforme puis précipité à l'isopropanol. L'ADN a été lavé deux fois avec de l'éthanol 70% avant d'être resuspendu dans 100µL de tampon 0,5x EB (10mM Tris-HCL pH=8,5) (Figure III-3).

L'ADN a ensuite été digéré par l'enzyme NotI permettant sa fragmentation

Résultats expérimentaux

d'une part mais aussi permettant de couper dans le transposon (Figure III-3). Dix microgrammes d'ADN extraits ont été incubés pendant 7h à 37°C avec 2µL d'enzyme NotI (10U/µL). L'enzyme a été inactivée par une étape à 70°C pendant 10min. L'ADN a ensuite été précipité pour ne conserver uniquement les fragments inférieurs à 300pb en utilisant un gradient de polyéthylène glycol (PEG). Deux cents microlitres de tampon 4x (2,2M NaCl, 40mM NaH₂PO₄, 32% PEG8000) ont été ajoutés aux digestions précédentes et homogénéisées par vortex. Les mixtures ont été incubées dans de l'eau froide contenant de la glace à 4°C pendant 16h et ensuite centrifugées pendant 20min à 13000rpm à 4°C. Un lavage avec du tampon 1x a été effectué suivi de 2 lavages en éthanol 70%. Après avoir retiré l'excès d'éthanol par séchage, les culots ont été resuspendus dans 50µL de tampon EB 0,5x (Figure III-3).

Les adaptateurs biotinylés TM214 et TM215 (Tableau III-2) ont été utilisés pour apporter le tag biotine aux fragments d'ADN (Figure III-3). Les adaptateurs ont été resuspendus à une concentration de 100µM puis incubés à 95°C pendant 5min suivi d'un refroidissement de 0,1°C/s jusqu'à 4°C et dilués dans du tampon de T4 ligase (NEB®) 1x. La réaction de ligature s'est effectuée de la façon suivante : 8µg d'ADN, 15µL de tampon T4 ligase, 3µL de T4 ligase dans un volume final de 100µL. La réaction a été incubée pendant 18h à 16°C au bain marie. Après purification en gradient de PEG8000, une digestion par l'enzyme MmeI a été effectuée pour libérer la jonction ADN/transposon (Figure III-3) avec les amorces M12F et M12R. Les amorces M12F et M12R ont été incubées de la même façon que les adaptateurs TM214 et TM215. La totalité de l'ADN purifié en PEG8000 a été utilisée avec 2µL de MmeI (10U/µL) (NEB®), 50µM amorces M12, 32mM SAM, 1X tampon CutSmart. La réaction a été incubée pendant 2h à 37°C au bain marie et les échantillons ont été conservés à -20°C après digestion (Figure III-3).

Résultats expérimentaux

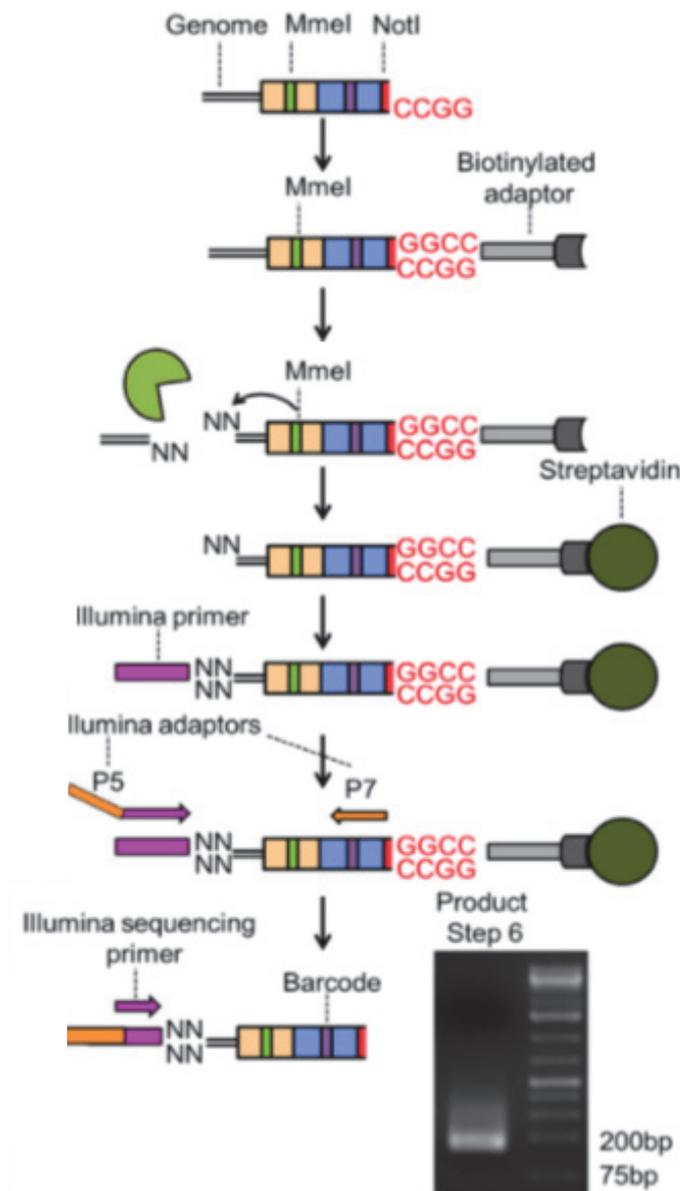


Figure III-3: Etape de préparation des banques de transposon pour le séquençage NGS. La digestion NotI permet de fragmenter les génomes bactériens et de libérer les 4 nucléotides CCGG au niveau du site enzymatique. La ligation des adaptateurs biotinylés s'effectue par complémentarité des bases libérées à l'étape précédente. La digestion MmeI libère 16 nucléotides du génome bactérien en amont du transposon. Après purification sur billes de streptavidine, la ligation des adaptateurs illumina permet l'insertion de barcodes et des adaptateurs nécessaires au séquençage. La PCR finale amplifie les fragments de 180pb correspondant à la jonction transposon/ADN génomique qui sont purifiés sur gel d'araose 2%. D'après Santiago et al., 2015.

Résultats expérimentaux

Tableau III-2 : Amorces et adaptateurs utilisés au cours de cette étude. Les barcodes sont soulignés et mis en gras pour les adaptateurs du Tn-seq.

Nom	Séquences
TM214	5biotinTEG/CGTTAGTAACCTTGCATGTC
TM215	GGCCCAACGTGAATCGACATCGCAAGGT
M12F	CTGTCCGTTCGACTACCCTCCCGAC
M12R	GTCGGGAGGGTAGTCGGAACGGACAG
LIB_AdaptT_1_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>AGTCATGC</u> NN
LIB_AdaptT_2_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>ACGTA</u> CTGNN
LIB_AdaptT_3_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>TGACTGC</u> ANN
LIB_AdaptT_4_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>TCGACG</u> ATNN
LIB_AdaptT_5_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>CTAGC</u> ATGNN
LIB_AdaptT_6_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>GACTGT</u> ACNN
LIB_AdaptT_7_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>ACGATCT</u> GNN
LIB_AdaptT_8_long	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <u>TGCAGCT</u> ANN
LIB_AdaptB_1_long	<u>GCATGACT</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_2_long	<u>CAGTACGT</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_3_long	<u>TGCAGTCA</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_4_long	<u>ATCGTCG</u> AGATCGGAAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_5_long	<u>CATGCTAG</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_6_long	<u>GTACAGTC</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_7_long	<u>CAGATCGT</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
LIB_AdaptB_8_long	<u>TAGCTGCA</u> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA
TM199	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAAGACCACGCGTGCCATAAC
LIB_PCR_3	AATGATACGGCGACCACCGAACACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTCCGATCT

Résultats expérimentaux

Les fragments de digestion ont été purifiés à l'aide du kit Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen®). Les fragments ont été suspendus dans 200µL de tampon B&W (2M NaCl, 110mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA). Trente-deux microlitres de billes (pour un échantillon) ont été lavés 3 fois par ajout de 1mL de tampon B&W et resuspendus dans un volume final de 32µL de tampon B&W. Ces billes lavées ont été ajoutées aux fragments et ce mélange a été incubé pendant 1h à température ambiante avec une resuspension toutes les 10min. Les échantillons ont été placés dans un collecteur magnétique de particules (MPC) puis lavés 1 fois dans du tampon LoTE (3mM Tris-HCl pH7,5, 0,5M EDTA) + Tween 0,05% et 2 fois dans du tampon LoTE sans Tween. Les échantillons ont été ensuite transférés (100µL) dans des tubes PCR et incubés sur la nuit à 4°C (Figure III-3)

L'avant-dernière étape consiste en la ligature des adaptateurs illumina pour le séquençage. Tous les échantillons seront séquencés sur la même ligne de séquençage. Des adaptateurs avec différents barcodes ont donc été utilisés pour faciliter l'étape de dé-multiplexage (Tableau III-2). Les couples d'adaptateurs (LIB_AdapT_x_long / LIB_AdapB_x_long, où x est le numéro d'adaptateur compris entre 1 et 8) ont été incubés comme vu précédemment pour les amorces TM214 et TM215. Les billes ont été collectées à l'aide du MPC pendant 2min et 18,4µL du mix de ligature (16,4µL ddH₂O et 10x de tampon T4 ligase) y ont été ajoutés. Ensuite, 0,6µL des adaptateurs ont été ajoutés aux tubes (un adaptateur par condition) et la ligature s'est effectuée en présence de 1µL de T4 ligase (1U/µL) (NEB®) pendant 7h à 16°C avec une homogénéisation par pipetage toutes les 15min. Après la période d'incubation, 150µL de LoTE + 0,05% Tween ont été ajoutés et deux lavages successifs avec le tampon LoTE ont été effectués. L'amplification de la jonction ADN/transposon finale a été réalisée à l'aide de la polymérase haute-fidélité Phusion (Thermo®) en suivant les recommandations du fournisseur et à l'aide des amorces TM199 et LIB_PCR_3. La migration des produits de PCR a été effectuée sur un gel d'agarose 2%. Les bandes à la taille de 180pb ont été découpées et l'ADN purifié à l'aide du kit Qiagen® gel extraction (Figure III-3).

Séquençage et analyse bio-informatique.

Le séquençage des ADNs purifiés à l'étape précédente a été effectué à l'aide d'un MiSeq (Illumina®). FastQC a été utilisé pour vérifier la qualité des reads. Ensuite, les

Résultats expérimentaux

reads ont été démultiplés suivant les barcodes utilisés pour identifier chaque condition. Les adaptateurs de séquençages ont été ensuite retirés à l'aide de Cutadapt (Martin, 2011) et les reads nettoyés ont été soumis au logiciel TPP (Tn-seq Pre-processor). Cette étape permet d'aligner les reads sur un génome de référence (eg. SA31 et HGO03) à l'aide du logiciel BWA (Li and Durbin, 2009) tout en comptant le nombre d'insertion du transposon au niveau des sites individuels dinucléotidiques TA. Les calculs statistiques pour déterminer l'essentialité des gènes ont été effectués à l'aide du logiciel Transit (DeJesus et al., 2015). La méthode dite de « re-sampling » a été utilisée : pour chaque gène, la différence de reads entre la coculture et la monoculture (e.g. SA31+PA69vsSA31) a été calculée puis, comparée à une distribution générée aléatoirement de l'insertion du transposon sur la totalité des sites TA de l'ensemble du génome avec un test de significativité (Mann-Whitney). Une visualisation de l'insertion du transposon sur le génome de SA31 et HGO03 est donnée en **Figure III-4**. On considère un gène essentiel si la différence de comptage de reads (FC pour fold-change) entre la coculture et la monoculture est supérieure ou inférieure à 2 avec une p_value ajustée $< 0,05$. La fonction des gènes identifiés a été prédite à l'aide de la base de données KEGG (disponible sur le site <https://www.genome.jp/kegg/>).

Résultats expérimentaux

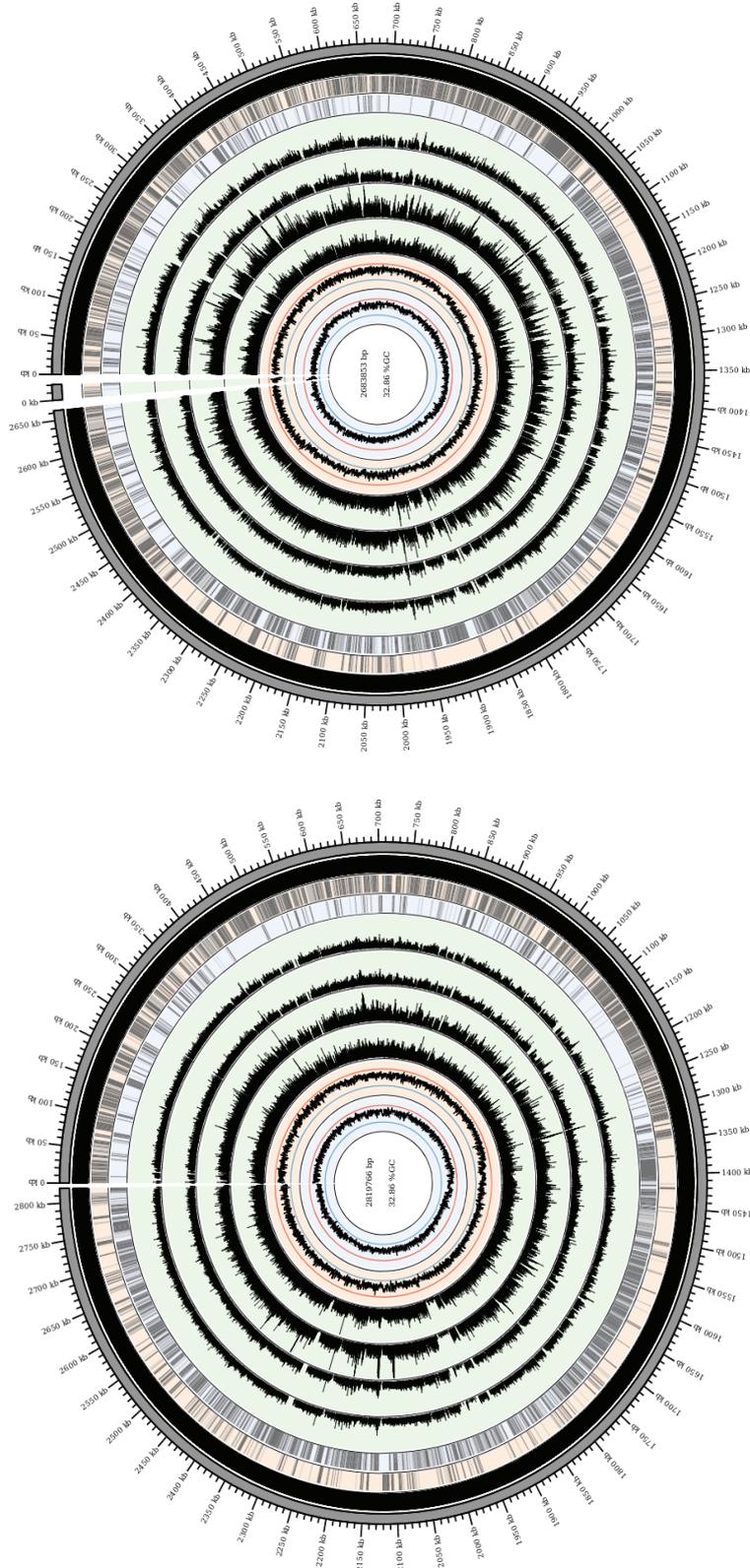


Figure III-4 : Visualisations de l'insertion des transposons dans HG003 (A) et SA31 (B). Le programme Circos a été utilisé pour aligner l'insertion du transposon sur les génomes. Le cercle intérieur bleu représente le taux de GC%, le cercle rouge le GC skew. Les histogrammes en noirs des zones vertes montrent le nombre de reads par site TA. Du premier cercle vert à l'intérieur au 4^{ème} vers l'extérieur : banque, monoculture, coculture avec PA69 et coculture avec PA2600. Le cercle bleu extérieur indique les CDS sur le brin antisens et le cercle rouge sur le brin sens.

Résultats expérimentaux

Résultats

Construction des banques de transposon

Les banques de transposons ont été construites dans la souche de référence LUG2961 (HG003) et la souche clinique issue d'un patient CF SA31. Ces deux souches ont été choisies car étant sensibles à la kanamycine et à l'érythromycine, antibiotiques utilisés pour l'acquisition de la transposase et du transposon, et sensibles à l'infection par le phage $\Phi 11 ::$ FRT. La souche HG003 a été préférée aux souches de la même lignée : HG002, HG001 et 8324-4, car réparée dans les régulateurs RsbU et TcaR (Santiago et al., 2015).

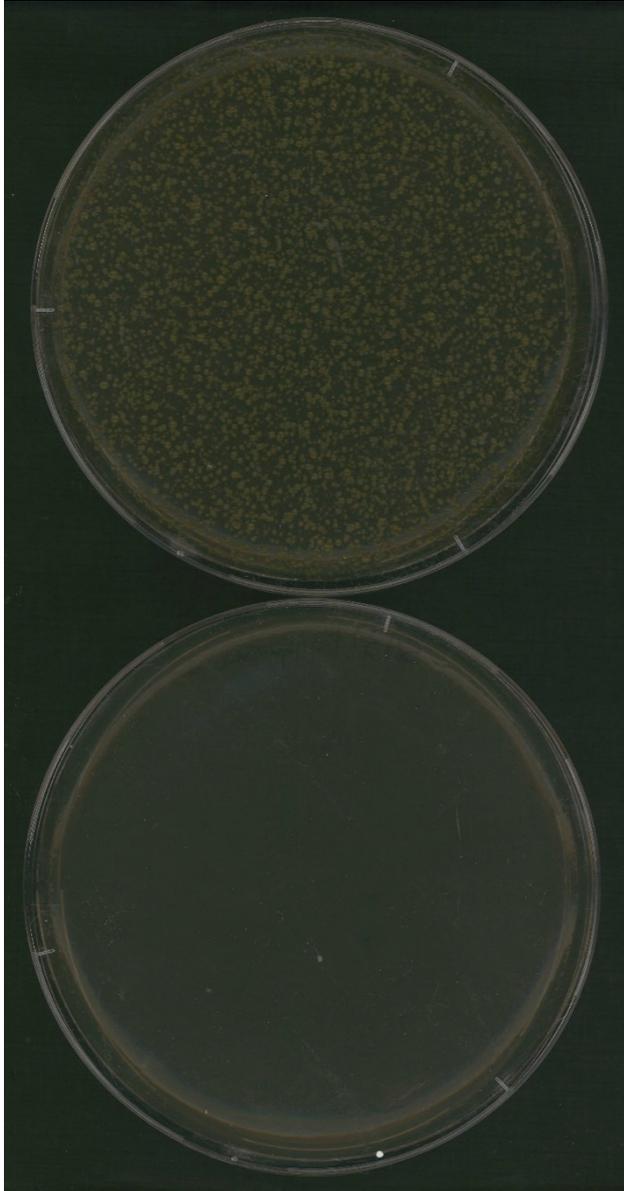
Pour la construction des banques, les souches SA31 et HG003 ont été transformées avec le plasmide pTM231 ou pTM232 permettant l'expression de la transposase active ou mutée, puis infectées par le phage $\Phi 11 ::$ FRT porteur du transposon. Le nombre de colonies estimé ayant inséré le transposon pour la souche HG003 est de 500,000 tandis que pour la souche clinique SA31, le nombre estimé est de 370,000. Pour les souches porteuses de la transposase mutée (tnpase-), seulement quelques colonies ont été comptées sur les géloses indiquant alors un très faible bruit de fond (**Figure III-5**). Les deux banques sont assez denses (au minimum 300,000 colonies) pour pouvoir être utilisées.

Le nombre de reads obtenus après séquençage est de 14 millions pour la banque SA31 et de 16 millions pour HG003. Après avoir éliminé les reads de mauvaises qualités et éliminé les reads s'alignant plus d'une fois sur le génome, nous obtenons 6 millions de reads alignés pour SA31 et 10,5 millions de reads alignés pour HG003. Au total, les transposons se sont insérés dans 113,341 sites TA sur 253,983 (44,6%) pour SA31 ($\approx 93\%$ des gènes impactés) et 168,222 sites TA sur 269,536 (62,4%) pour HG003 ($\approx 94\%$ des gènes impactés).

Identification des gènes essentiels à la coculture.

Les banques de transposons construites ont été cultivées en absence (monoculture) ou en présence (coculture) de *P. aeruginosa* PA69 ou PA2600 pendant 36h avec une dilution toutes les 12H pour maintenir la croissance bactérienne. Les

Résultats expérimentaux



S. aureus pTM231

S. aureus pTM232

Figure III-5 : Construction des banques de Tn-seq. Les souches (HG003 et SA31) ont été transformées par le plasmide pTM231 qui code pour une transposase active permettant l'insertion du transposon et l'acquisition de la résistance à l'érythromycine. Les souches *S. aureus* pTM232 exprime une transposase tronquée ne permettant pas l'insertion du transposon. Les souches *S. aureus* pTM232 résistantes à l'érythromycine sont des mutants spontanés et permettent d'estimer le nombre de faux positifs de la banque de transposon.

Résultats expérimentaux

bactéries ont été inoculées à environ $5 \cdot 10^6$ UFC/mL en début d'expérience (T_0) puis ont atteint à 12h 10^9 UFC/mL (Figure III-6). Au point 24h, et 36h, la concentration bactérienne de *S. aureus* en mono- ou coculture reste stable. Concernant *P. aeruginosa*, une croissance similaire à *S. aureus* est observée. La cinétique de croissance des souches SA31 et HG003 en coculture avec PA69 et PA2600 est identique à leurs monocultures respectives. L'état de coexistence ainsi que la pression de sélection ont bien été conservés (Figure III-6).

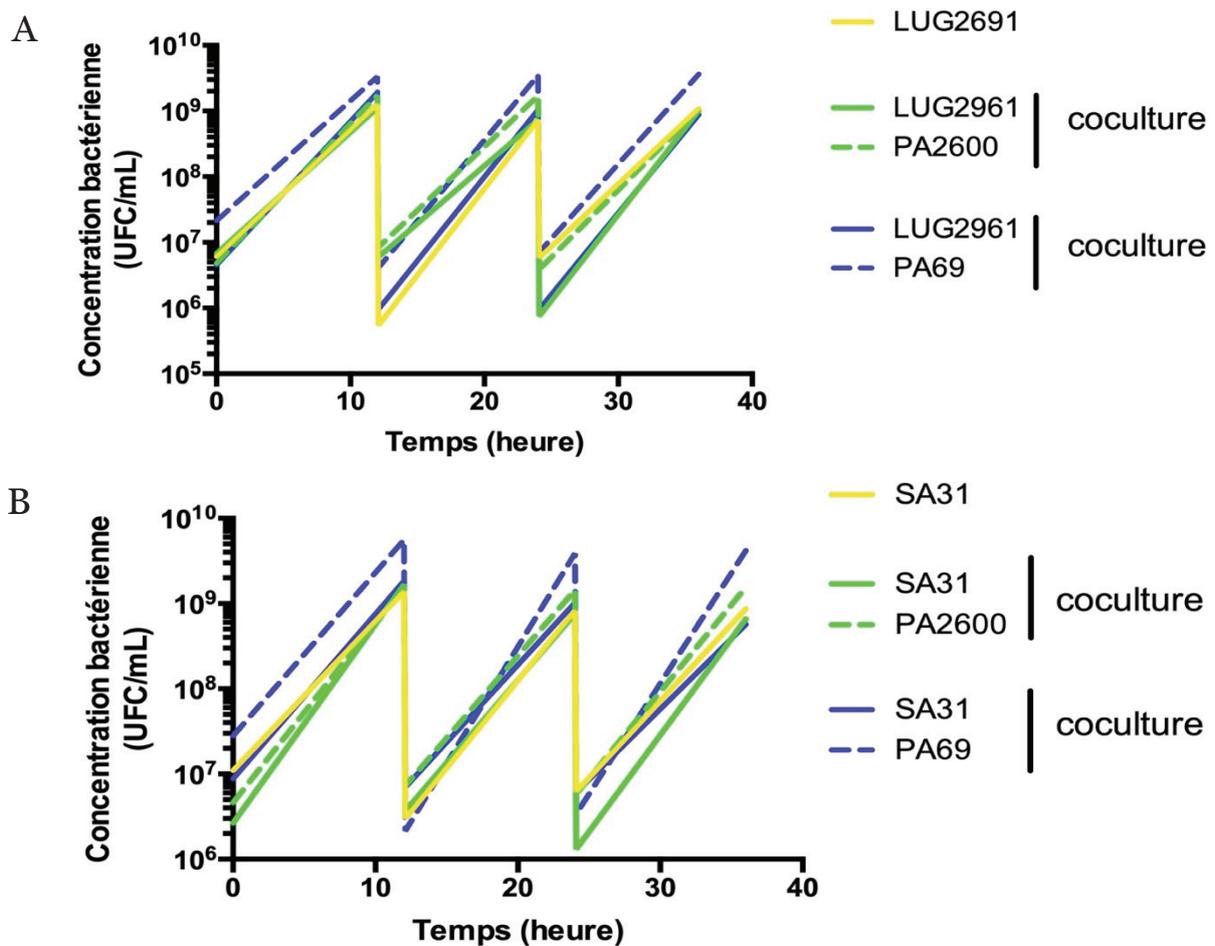


Figure III-6 : Cinétique bactérienne des banques de transposons en coculture avec *P. aeruginosa*. Les banques HG003 (A) et SA31 (B) ont été mises en monoculture (trait jaune plein) ou en coculture avec *P. aeruginosa* PA2600 (traits pleins verts) ou PA69 (traits pleins bleus) à un ratio 1:1 pendant 36h avec une dilution à $DO=0,1$ toutes les 12h dans du BHI à 37°C , 200rpm. La présence de *P. aeruginosa* a aussi été vérifiée (PA2600 traits pointillés vert ; PA69 traits pointillés bleus). Les bactéries ont été étalées sur milieu sélectif, MSA pour *S. aureus* et cétrimide pour *P. aeruginosa*.

Résultats expérimentaux

Après séquençage au bout des 36h de cultures, 7 millions et 9,5 millions de reads uniques ont été alignés respectivement pour les monocultures SA31 et HGO03. Au total, 101,708 (40%) et 153,206 (56,8%) sites TA ont été impactés par l'insertion du transposon (Tableau III-3). La diminution de la densité en monoculture par rapport aux banques de départ correspond à la pression de sélection exercée par la pousse en milieu BHI pendant 36h (perte de 6 à 8% de densité). Pour les cocultures, un nombre de reads unique plus faible (3,5 millions à 2,5 millions) ont pu être alignés : SA31, 20,7% (SA31+PA69) et 21,8% (SA31+PA2600) des sites TA totaux sont concernés par l'insertion du transposon. Pour les cocultures HGO03, environ 3 millions de reads uniques ont pu être alignés représentant 31,3% (HGO03+PA2600) et 29,3% (HGO03+PA69) des sites TA totaux (Tableau III-3). La diminution de la densité d'insertion des sites TA est liée au faible nombre de reads alignés sur les génomes de référence. A l'aide du programme CIRCOS, les reads alignés peuvent être visualisés sur les génomes de références indiquant alors une bonne représentativité de l'insertion des transposons au niveau des sites TA (Figure III-4).

Tableau III-3 : Nombre de reads et densité d'insertion du transposon dans les banques ainsi que pour les mono- et cocultures

Souches	Nombre de reads uniques alignés	Nombre de site TA total	Nombre de site TA impactés	Densité
SA31 banque	6,000,000	253,983	113,341	44,6%
LUG2961 banque	10,500,000	269,536	168,222	62,4%
SA31 monoculture	7,000,000	253,983	101,708	40,0%
LUG2961 monoculture	9,500,000	269,536	153,206	56,8%
SA31+PA69	2,500,000	253,983	52,653	20,7%
SA31+PA2600	2,500,000	253,983	55,462	21,8%
LUG2961+PA69	3,500,000	269,536	78,771	29,2%
LUG2961+PA2600	3,000,000	269,536	84,241	31,3%

Résultats expérimentaux

Les gènes essentiels communs chez SA31 entre les 2 cocultures (PA2600 et PA69) sont au nombre de 17 tandis que le nombre de gènes essentiels communs pour HG003 (PA2600 et PA69) est de 44 (Tableau III- et Tableau III-5). En croisant les deux tableaux, c'est à dire en dressant les gènes communs entre SA31 et HG003, nous obtenons une liste de 13 gènes (Tableau III-6). Un seul gène parmi les 13 apporte un avantage à *S. aureus* lorsqu'il est impacté par le transposon. Le gène SQF73424.1 de fonction inconnue semble désavantager *S. aureus* en croissance avec *P. aeruginosa* ($\log_2FC = 1,04 \pm 0,03$). On peut classer 10 des 12 gènes restants en deux grandes catégories distinctes. La première catégorie regroupant les gènes ayant une fonction régulatrice (*ccpA*, *agrA/agrC*, *sigB* et *rsbU*). Les gènes *rsbU* et *sigB* sont en opéron avec le gène *rsbV* qui est retrouvé uniquement au sein de la souche HG003 (Tableau III-5). Les gènes *agrA* et *agrC* impliqués dans le quorum-sensing de *S. aureus* sont les gènes montrant le plus d'impact en coculture avec *P. aeruginosa* ($\log_2FC = -4,54 \pm 0,79$ et $-4,88 \pm 0,4$ respectivement). On retrouve aussi tous les autres gènes de l'opéron *agr*, *agrB* et *agrD* ainsi que l'effecteur majeur RNIII comme étant essentiel dans la souche HG003 mais pas dans la souche SA31 (Tableau III-4 et Tableau III-5). La seconde catégorie de gènes est impliquée dans le métabolisme et le transport des acides aminés (SAOUHSC_01354, *gcvPB*, *aspC*, *glyA*, SAOUHSC_02699) (Tableau III-7). Les gènes restants, *fold* et *yhhT_2* interviendraient dans le métabolisme des carbohydrates et le transport d'auto-inducer AI-2 respectivement. Ainsi, les grands régulateurs majeurs de *S. aureus*, le système *agr*, la réponse aux stress, la répression catabolique et le métabolisme de certains acides aminés semblent être important pour le maintien de *S. aureus* avec *P. aeruginosa*.

Résultats expérimentaux

Tableau III-4 : Gènes essentiels chez SA31 communs aux deux cocultures PA2600 et PA69. Les FC sont représentés en valeur log2.

Nom gène	Tag CDS 8325	FC PA69	padj PA69	FC PA2600	padj PA2600
folD	cds-SQF73264.1	-2.75	0.01204	-2.83	0.00000
purL	cds-SQF73270.1	-2.96	0.00000	-1.76	0.00000
SQF73424.1	cds-SQF73424.1	1.04	0.02149	1.02	0.01881
SQF73560.1	cds-SQF73560.1	-1.13	0.00000	-1.62	0.00000
yhhT_2	cds-SQF73562.1	-5.81	0.00000	-1.53	0.00000
mprF	cds-SQF73563.1	2.94	0.00000	-1.82	0.00000
gcvPB	cds-SQF73796.1	-1.46	0.00000	-1.12	0.02839
ccpA	cds-SQF73981.1	-2.05	0.00000	-3.08	0.00000
aspC	cds-SQF74249.1	-3.00	0.00000	-2.65	0.00000
agrC	cds-SQF74337.1	-4.46	0.00000	-4.76	0.00000
agrA	cds-SQF74338.1	-3.25	0.00000	-5.34	0.00000
sigB	cds-SQF74363.1	-1.59	0.01204	-1.69	0.01881
rsbU	cds-SQF74366.1	-1.13	0.02149	-1.74	0.00000
atpA	cds-SQF74403.1	-2.27	0.00000	-1.69	0.01368
glyA	cds-SQF74411.1	-1.60	0.00000	-1.77	0.00836
tcyB	cds-SQF74675.1	-2.09	0.00000	-1.39	0.01368
SQF74719.1	cds-SQF74718.1	-2.39	0.00000	-1.71	0.01881

Résultats expérimentaux

Tableau III-5 : Gènes essentiels chez HGO03 communs aux deux cocultures PA2600 et PA69. Les FC sont représentés en valeur log2.

Nom gène	TAG CDS	FC	padj	FC	padj
	NCTC8325	PA69	PA69	PA2600	PA2600
deoB	cds-SQF72468.1	-1.15	0.00000	-1.03	0.02665
mccB	cds-SQF72758.1	-1.34	0.01049	-2.12	0.00000
cysK	cds-SQF72810.1	2.62	0.01049	2.78	0.00718
lysP_1	cds-SQF72855.1	-1.20	0.00000	-1.02	0.00718
fold	cds-SQF72879.1	-2.74	0.00000	-1.26	0.01271
purS	cds-SQF73264.1	-2.31	0.00623	-1.97	0.02665
purF	cds-SQF73268.1	-2.84	0.00000	-1.52	0.00000
purH	cds-SQF73271.1	-4.05	0.00000	-1.23	0.03050
purD	cds-SQF73274.1	-1.67	0.00000	-1.38	0.02319
ptsH	cds-SQF73275.1	-2.66	0.00000	-1.97	0.03887
SQF73317.1	cds-SQF73283.1	-1.87	0.03185	-2.25	0.00718
rsmB	cds-SQF73317.1	1.12	0.02232	1.46	0.00000
SQF73424.1	cds-SQF73415.1	1.08	0.01049	1.02	0.00718
SQF73560.1	cds-SQF73424.1	-1.43	0.00000	-1.61	0.00000
yhhT_2	cds-SQF73560.1	-5.67	0.00000	-1.70	0.00000
arlR	cds-SQF73562.1	-1.62	0.02855	-1.71	0.00718
gpsB	cds-SQF73617.1	-2.24	0.02232	-2.33	0.00000
gcvPB	cds-SQF73645.1	-1.91	0.00000	-1.28	0.00000
hemL	cds-SQF73796.1	3.54	0.00623	3.49	0.00000
nrnA	cds-SQF73914.1	-3.19	0.00000	-3.19	0.00000
ccpA	cds-SQF73950.1	-1.90	0.00000	-3.44	0.00000
SQF74109.1	cds-SQF73981.1	1.79	0.00000	1.87	0.00000
SQF74150.1	cds-SQF74109.1	3.21	0.00000	3.18	0.00000

Résultats expérimentaux

SQF74151.1	cds-SQF74150.1	2.99	0.00000	3.31	0.00000
SQF74241.1	cds-SQF74151.1	-1.57	0.00000	-1.36	0.02319
aspC	cds-SQF74241.1	-3.47	0.00000	-2.30	0.00000
agrB	cds-SQF74249.1	-4.03	0.00000	-4.95	0.00000
agrD	cds-SQF74335.1	-5.03	0.02509	-4.53	0.03050
agrC	cds-SQF74336.1	-4.75	0.00000	-5.54	0.00000
agrA	cds-SQF74337.1	-4.58	0.00000	-5.00	0.00000
scrR	cds-SQF74338.1	-1.44	0.00000	-1.16	0.01836
mutS_2	cds-SQF74341.1	-1.12	0.00000	-1.16	0.00718
sigB	cds-SQF74347.1	-1.76	0.01479	-1.74	0.00718
rsbW	cds-SQF74363.1	-1.75	0.02232	-1.81	0.01271
rsbV	cds-SQF74365.1	-1.99	0.00623	-1.84	0.01836
rsbU	cds-SQF74366.1	-1.86	0.00000	-1.84	0.00000
ydcE	cds-SQF74368.1	-1.69	0.02509	-2.04	0.01271
ftsW_2	cds-SQF74383.1	-1.19	0.00000	-1.15	0.01271
glyA	cds-SQF74411.1	-1.09	0.01479	-1.37	0.00718
sarR	cds-SQF74587.1	-2.12	0.00623	-1.92	0.00000
odh	cds-SQF74593.1	-1.33	0.00000	-1.24	0.00000
gltT	cds-SQF74675.1	1.88	0.00000	2.39	0.00000
SQF74719.1	cds-SQF74719.1	-2.95	0.00000	-2.68	0.00000
NCTC8325_srn_3910_					
RNAIII	NA	-3.04	0.02232	-4.15	0.00000

Résultats expérimentaux

Tableau III-6 : Gènes essentiels communs entre HGo03 et SA31 en coculture avec PA69 et PA2600 et leur fonction chez *S. aureus*. L'étoile à côté du nom du gène indique une fonction prédite.

Nom gène	Fonction	Tag 8325	Tag KEGG
folD	Métabolisme des carbohydrates	SAOUHSC_01007	K01491
SQF73424.1*	Inconnu	SAOUHSC_01193	K07030
SQF73560.1*	Transporter amino acids	SAOUHSC_01354	x
yhhT_2*	Putative transporter	SAOUHSC_01358	K03310
gcvPB	Métabolisme des amino-acids	SAOUHSC_01632	K00283
ccpA	Régulateur transcriptionnel	SAOUHSC_01850	K02529
aspC	Métabolisme des amino-acids	SAOUHSC_00989	K00813
agrC	Quorum-sensing	SAOUHSC_02264	K07706
agrA	Quorum-sensing	SAOUHSC_02265	K07707
sigB	Régulateur transcriptionnel	SAOUHSC_02298	K03090
rsbU	Phosphatase sigB regulon	SAOUHSC_02301	x
glyA	Métabolisme des amino-acids	SAOUHSC_02354	K00600
SQF74719.1*	Transporter des amino acids	SAOUHSC_02699	K02424

Résultats expérimentaux

Discussion

Le transposon séquençage est un outil puissant qui permet d'étudier l'essentialité des gènes dans une condition donnée. Il a déjà été utilisé chez *S. aureus* pour la recherche de ces gènes lors de croissance à haute température (Saantiago et al., 2015) ou encore lors de modèles infectieux (Valentino et al., 2014). Dans nos conditions, les informations acquises sont précieuses pour appréhender les déterminants génétiques lors d'interactions bactériennes. La première étape de cette analyse est la construction de banque avec un haut niveau de saturation d'insertion du transposon. A l'aide de l'apport du transposon par un phage, nous avons construit deux banques de transposon, l'une dans une souche de référence HGO03 et l'autre dans une souche clinique de *S. aureus*, SA31, issue d'un patient atteint de mucoviscidose. En comparant le nombre de colonies de chaque banque à la littérature, la banque HGO03 contient plus de 500.000 insertions indépendantes tandis que la souche SA31 n'en possède uniquement 370.000. Deux précédentes banques chez la même souche HGO03 ont atteint plus de 71.000 (Valentino et al., 2014) et 694.000 insertions indépendantes (Santiago et al., 2015). Nos deux banques construites sont de densité assez haute pour permettre une interprétation robuste de nos résultats.

Après réalisation des mono- et cocultures et séquençage, nous remarquons une perte jusqu'à 6 millions de reads uniques alignés en cocultures comparé aux monocultures. Cette chute drastique est responsable de la densité d'insertion beaucoup plus faible des cocultures (20% de perte de densité pour SA31 et 25% de perte de densité pour HGO03 comparé aux monocultures). La pression de sélection occasionnée par *P. aeruginosa* peut être en partie responsable de cette diminution de densité mais une forte proportion de reads (8 millions) séquencés en coculture correspond à la jonction plasmide/transposon. Ces jonctions proviendraient d'une transposition non-continue où la transposase ne reconnaît pas son site ITR habituel et permet à un fragment du plasmide de s'intégrer dans le génome avec le transposon (Santiago et al., 2015). En comparaison, 3 millions de reads correspond à la jonction plasmide/transposon en monoculture. Ces jonctions sont normalement éliminées lors de la précipitation en PEG (voir matériels et méthodes). Il est probable que cette étape de précipitation en PEG élimine moins bien ces jonctions en coculture qu'en monoculture. En coculture, l'extraction d'ADN est réalisée sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* sans distinction ce qui peut entraîner des variations de la composition en

Résultats expérimentaux

sel, en ion et faire varier le pH, paramètres importants pour une précipitation efficace en PEG (Lis and Schleif, 1975). Une optimisation du protocole est nécessaire pour déterminer les meilleures conditions pour préparer l'ADN issu des cocultures. Une dialyse sur membrane peut être rajoutée au protocole pour diminuer la concentration en sels et en ions.

Le but de cette étude a été de trouver les gènes essentiels de *S. aureus* nécessaires à la coexistence avec *P. aeruginosa*. Nous avons comparé la densité d'insertion du transposon entre des monocultures (SA31 et HGO03) et des cocultures (SA31+PA69/PA2600 et HGO03+PA69/PA2600). En regardant attentivement les gènes communs essentiels à HGO03 et SA31 à leur maintien avec *P. aeruginosa*, nous observons que la banque SA31 montre moins de gènes essentiels que la banque HGO03 en coculture. En effet, une liste de 44 gènes est dressée pour HGO03 tandis que seulement 17 gènes sont retrouvés essentiels pour SA31. Un background génétique différent peut expliquer cette différence observée (souche clinique vs souche de référence). Chez SA31, nous retrouvons uniquement certains gènes d'opérons bien caractérisés comme *agrA* et *agrC* ou encore *rsbU* et *sigB*. Tandis que chez HGO03, nous retrouvons la totalité de ces opérons : *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* et *RNAlII* ainsi que *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* et *sigB*. Ces résultats tendent à confirmer que la banque SA31 n'est pas aussi saturée que HGO03 et qu'elle ne permet donc pas de révéler tous les gènes potentiels. C'est pourquoi, nous allons nous concentrer sur les gènes essentiels de HGO03.

Les résultats du Tn-seq sur la banque HGO03 montrent que les gènes essentiels possédant les plus hauts indices différentiels entre mono et cocultures (en dehors des gènes de fonctions inconnues) appartiennent à la catégorie des régulateurs transcriptionnels (Figure III-7). Parmi eux, nous retrouvons *ccpA* (catabolite control protein A) et *scrR* (sucrose operon repressor). La protéine CcpA est connue pour intervenir dans la répression catabolique du carbone et contrôle l'expression de *scrR* (Jankovic and Brückner, 2007). Cette régulation catabolique est un phénomène répandu dans toutes les bactéries qui permet la répression de l'expression de gènes

Résultats expérimentaux

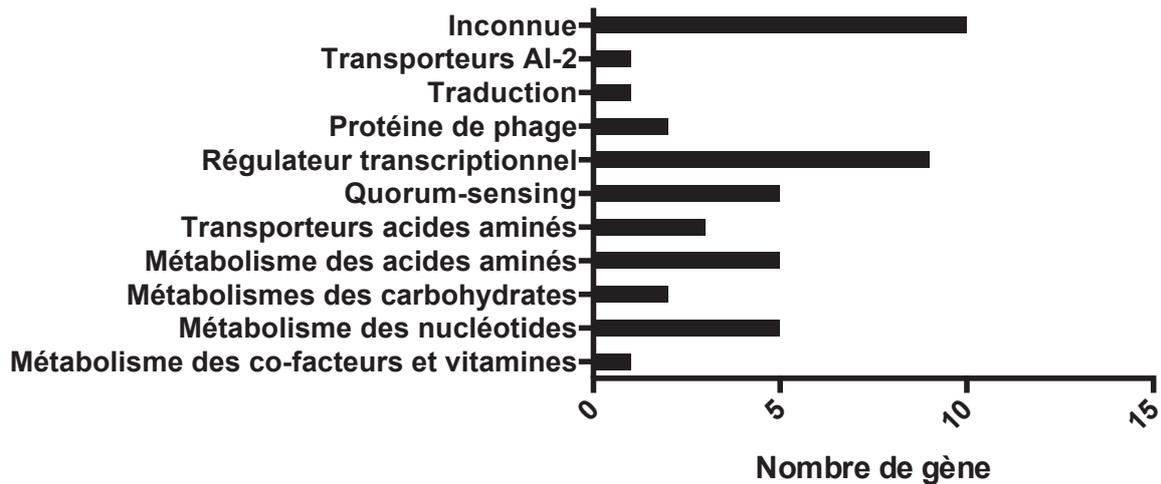


Figure III-7 : Catégories fonctionnelles des gènes essentiels de HGO03 en coculture avec PA2600 et PA69. La catégorie fonctionnelle de chaque gène a été recherchée sur le site KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>).

impliqués dans l'utilisation et le métabolisme du carbone en présence d'un substrat préférentiel (Seidl et al., 2008). Chez *Bacillus subtilis*, il a été montré que CcpA est capable de réguler environ 10% de l'expression du génome (Blencke et al., 2003). La croissance dans une source préférentielle de carbone inhibe l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation d'une source alternative. Chez *S. aureus*, une étude a montré que CcpA était essentiel à la croissance dans un milieu pauvre en glucose en réprimant les gènes impliqués dans la synthèse des carbohydrates et en induisant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (Halsey et al., 2017). En accord avec cela, nous retrouvons dans l'analyse des données du Tn-seq 3 gènes potentiellement impliqués dans l'import des acides aminés (*lysP_1* (Steffes et al., 1992), SQF74719.1 et SQF73560.1, fonctions prédites sur <https://www.genome.jp/kegg/>) et 5 gènes associés au métabolisme des acides aminés (*aspC*, *cysK*, *gcvPB*, *glyA* et *mccB*) (Liu et al., 2007; Schirch and Szebenyi, 2005; Yamamoto et al., 2011). De plus, un autre régulateur dans la régulation du métabolisme des acides aminés est prédit comme essentiel. La protéine ArlR fait partie d'un système à deux composants (TCS) : ArlR/ArlS (autolysis regulated locus, ArlRS) où ArlS est l'histidine kinase et ArlR le « response regulator » (Liang et al., 2005). Le rôle de ce TCS est multiple chez *S. aureus* ; il permet (i) de réguler négativement le système *agr* et positivement la production de sérines protéases impliquées dans l'échappement au système immunitaire (ii) l'inhibition des gènes impliqués dans l'import de sucre et l'induction de gènes impliqués dans l'utilisation des acides aminés comme source de

Résultats expérimentaux

carbone (Fournier and Hooper, 2000; Fournier et al., 2001; Liang et al., 2005). Ces résultats tendent à montrer que l'adaptation de *S. aureus* à un environnement pauvre en glucose est nécessaire pour la coexistence avec *P. aeruginosa*.

La 2nd catégorie de gènes regroupe le métabolisme des ribonucléotides à base purine avec une partie de l'opéron *pur* (*purH*, *purD*, *purF* et *purS*), *fold* et le gène *deoB* (Nordlund and Reichard, 2006; Saxild and Nygaard, 1991). Il semblerait que le métabolisme des purines soit important pour la coexistence. Deux moyens existent chez les bactéries pour la synthèse des ribonucléotides puriniques. La voie *de novo* produit à partir d'un précurseur (5' ribose phosphate) de l'inosine monophosphate (IMP) et la convertit ensuite en adénosine monophosphate (AMP) (gène *purA*) et guanosine monophosphate (GMP) (gène *gua*) (Seggewiß et al., 2006). Ces ribonucléotides monophosphatés peuvent ensuite être utilisés directement dans des processus cellulaires. Cette voie *de novo* fait intervenir l'opéron *pur* constitué des gènes *purE*, *purK*, *purC*, *purS*, *purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN*, *purH*, *purD* et *deoB* ainsi que d'autres gènes auxiliaires comme *glyA* et *fold*, ce dernier responsable de la synthèse de coenzymes folates requis pour la biosynthèse des purines (Seggewiß et al., 2006). Chez *B. subtilis*, la protéine PurR réprime tout l'opéron *pur* ainsi que les gènes *fold* et *glyA* (Seggewiß et al., 2006). La protéine PurR se lie au site opérateur des gènes qu'il contrôle et inhibe leur transcription. Cependant lors d'un déficit en purine, une augmentation de la quantité intracellulaire de phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) se produit et ce métabolite se fixe à PurR empêchant sa fonction inhibitrice (Saxild and Nygaard, 1991). La seconde voie de production des purines et la voie de recyclage faisant intervenir le gène *deoD*. Cette voie de recyclage récupère des bases purines libres, les dégrade pour les convertir en AMP/GMP/IMP (G. Ducati et al., 2011; Saxild and Nygaard, 1991). La régulation de ces gènes n'est pas encore bien caractérisée mais la présence de purines extracellulaires inhibe la voie *de novo* au profit de la voie de recyclage (Saxild and Nygaard, 1991). De façon intéressante, les gènes *purH*, *purD*, *purF* et *purS*, *fold*, *deoB* et *glyA* ressortent comme essentiels à la coexistence avec *P. aeruginosa*. Cependant une seule partie de l'opéron *pur* ressort de notre analyse et, très probablement, l'utilisation d'une banque avec une densité d'insertion du transposon plus élevée nous permettrait d'obtenir le reste des gènes de l'opéron. De plus, les gènes *glyA*, *fold* et l'opéron *pur* sont tous régulés négativement par le represseur *purR*. L'absence du gène *purR* dans la liste obtenue peut être aussi expliquée par la densité de notre banque ou que, dans nos conditions, le gène *purR*

Résultats expérimentaux

n'est pas nécessaire pour la régulation de ces gènes. En effet, un autre régulateur, positif cette fois-ci, a été décrit chez *Lactococcus lactis* (Kilstrup and Martinussen, 1998). Il n'est donc pas improbable qu'un autre régulateur ou qu'un des régulateurs majeurs de *S. aureus* (SarR, ArlRS, sigB, AgrA) de la liste soient impliqués dans la régulation du métabolisme de nucléotides. Le caractère essentiel de ce métabolisme suggère un besoin de synthèse des nucléotides à base purine pour la synthèse des acides nucléiques, la production d'énergie (ATP/GTP) ou la formation, entre autres, de cAMP/c-di-AMP. Ces dernières ont été décrites comme étant impliquées dans de nombreux processus bactériens tels que la formation de la paroi ou encore la répression catabolique chez *E. coli* (Kalia et al., 2012a). A faible concentration de glucose, cAMP est essentiel à l'activation de l'opéron *lac* qui code pour les protéines nécessaires à l'utilisation du lactose comme source préférentielle. Ainsi, on pourrait imaginer que la privation de glucose dans le milieu médié par *P. aeruginosa* nécessite un pool de cAMP provenant, à l'origine, de l'opéron *pur* qui serait essentiel à la répression catabolique chez *S. aureus*.

L'opéron du facteur sigma alternatif *sigB* semble aussi être essentiel en coculture. Le facteur SigB confère la spécificité du promoteur à l'ARN polymérase et est requis pour l'initiation de la transcription. Ce facteur régule notamment la réponse aux changements de conditions (stress) et permet à *S. aureus* de s'adapter à son environnement (Bischoff et al., 2001). *sigB* fait partie d'un opéron composé de *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, tous retrouvés après analyse des données du TN-seq. L'activité de SigB est régulée au niveau post-traductionnel par les protéines Rsb (regulation of sigma B). Pendant la phase exponentielle, l'anti facteur sigma RsbW séquestre SigB le rendant inactif. La liaison de RsbV à RsbW conduit à la libération de SigB pouvant alors remplir son rôle de régulation de l'ARN polymérase. Le gène *rsbU* quant à lui est nécessaire à l'activation de *sigB* et a été montré comme étant un activateur majeur lors de stress acide (Figure III-8) (Giachino et al., 2001; Kullik et al., 1998; Palma and Cheung, 2001). Ainsi le facteur SigB contrôle plus de 200 gènes chez *S. aureus* impliqués dans la virulence, la formation de biofilm, la persistance ou encore la résistance aux antibiotiques (Guldimann et al., 2016). L'essentialité de cet opéron est très intéressante car il montre que *S. aureus* doit être capable de s'adapter à un stress environnemental et d'adapter l'expression de ces gènes à la présence de *P. aeruginosa*. La nature de ce stress reste à être déterminée.

Résultats expérimentaux

D'autres régulateurs globaux de *S. aureus* tels que SarR ressortent aussi de l'analyse comme étant essentiels. La protéine SarR fait partie de la famille des protéines Sar et possède une activité régulatrice majeure des gènes accessoires de *S. aureus*. Même si le régulon de SarR reste encore inconnu à ce jour, une activité répresseur sur le système *agr* a été montrée (Reyes et al., 2011). Son rôle dans la coexistence avec *P. aeruginosa* nécessite des études plus approfondies sur les cibles potentielles de SarR.

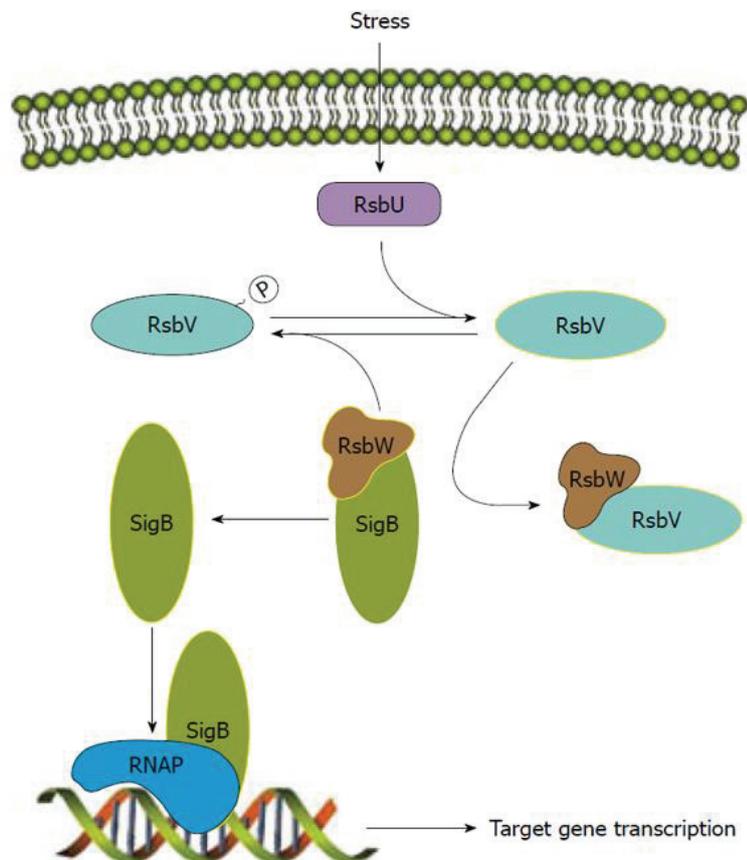


Figure III-8 : Régulation médiée par SigB. A l'état basal, le facteur sigB est séquestré par le facteur anti-sigma RsbW. RsbW promeut la phosphorylation de l'anti-anti facteur sigma B, RsbV qui sous cette forme phosphorylée est inactive. A la perception d'un stress, RsbU déphosphoryle RsbV qui peut se fixer à RsbW. Le facteur sigB étant libre, il peut se complexer à l'ARN polymérase et activer la transcription des gènes cibles (Junecko et al., 2012).

Résultats expérimentaux

Enfin, tous les gènes du système *agr* de *S. aureus* ressortent comme essentiels à la coexistence avec *P. aeruginosa*. Le quorum-sensing est l'un des mécanismes les plus importants pour le contrôle des gènes impliqués dans la pathogénie de *S. aureus* (Figure III-9). Le locus *agr* mesure 3,5kb et se compose en deux unités transcriptionnelles appelées RNAII, contrôlé par le promoteur P2, et RNAIII, contrôlé par le promoteur P3 (Figure III-9). Le locus RNAII se décompose en 4 gènes, *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*. *agrD* code pour un précurseur peptidique extracellulaire appelé peptide autoinducer (AIP). *AgrB* est une protéine transmembranaire avec une activité endopeptidase qui mature les AIP et les exporte. *AgrC* et *AgrA* correspondent à un TCS où *AgrC* est le senseur à activité histidine kinase phosphorylant *AgrA*, le « response regulator » après fixation des AIPs. Une fois phosphorylé, *AgrA* se fixe au promoteur P2 et P3 ainsi qu'au promoteur exprimant les toxines « peptides solubles modulines » (PSM). Conservées au sein de *S. aureus*, des variations dans la séquence de *agrB/C/D* amène à l'apparition de variants de *agr* (4 au total) qui produisent 4 types d'AIPs différents. Ces AIPs activent le QS de leur propre groupe tout en inhibant les groupes différents (Ji et al., 1995, 1997; Lina et al., 1998; Novick and Geisinger, 2008). De plus le système *agr* peut aussi être contrôlé par d'autres régulateurs tels que SarA, SsrA/B ou des facteurs environnementaux comme la concentration en glucose extracellulaire ou le pH (Regassa et al., 1992). Cette essentialité du système *agr* est cohérente avec les gènes du métabolisme du glucose observés parallèlement et montrerait un appauvrissement du milieu en carbohydrate. RNAIII est l'effecteur majeur du QS et est responsable du contrôle de l'expression des cibles du système *agr*. C'est aussi un ARNm qui code pour la delta-hemolysine. La régulation par RNAIII se fait principalement par un appariement antisense à l'extrémité 5'UTR des ARNm cibles (Janzon et al., 1989; Morfeldt et al., 1995; Novick et al., 1993). Par ce mécanisme, il réprime l'expression de protéine de surface comme la protéine A (*spa*) ou encore la traduction du répresseur de toxine Rot (Boisset et al., 2007), contrôlant lui-même l'expression d'exoprotéines et toxines. Les résultats du Tn-seq indiquent donc qu'un système *agr* actif serait nécessaire à la coexistence, et suggère qu'une adaptation de l'expression des facteurs de virulence serait nécessaire.

En conclusion, la construction de deux banques de mutants, l'une dans une souche de référence HGO03 et l'autre dans une souche clinique SA31 issue d'un patient CF nous ont permis de révéler des gènes essentiels à *S. aureus* pour son maintien avec *P. aeruginosa*. Quand bien même la banque SA31 agit comme un facteur limitant, cette

Résultats expérimentaux

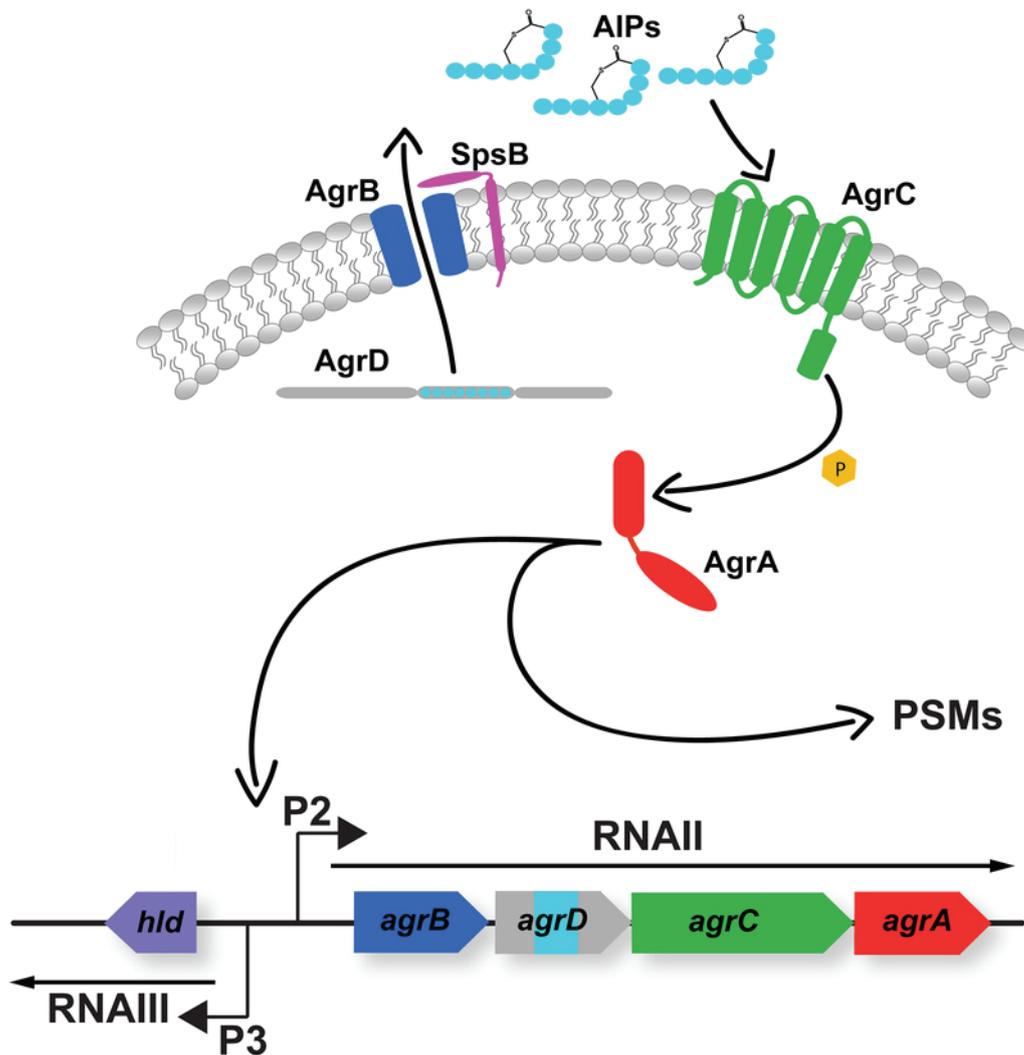


Figure III-9 : Fonctionnement du système agr chez *S. aureus*. Le précurseur du peptide autoinducer (AIP) est produit par le gène agrC. Il est exporté par l'intermédiaire de agrB avec l'aide de la peptidase SpsB, maturant le précurseur. Quand la concentration extracellulaire atteint un seuil critique, l'histidine kinase AgrC est activé et phosphoryle le « response regulator » AgrA qui contrôle l'expression du promoteur P2 et P3. Les unités de transcription correspondantes, RNAII et RNAIII codent respectivement pour les gènes agr et pour RNAIII, molécule effectrice majeure du système agr contrôlant l'expression de nombreux gènes cibles. AgrA active aussi directement le promoteur des phenol-soluble modulins (PSMs) (Jenul and Horswill, 2018)

Résultats expérimentaux

banque confirme l'analyse des données de HGO03 nous informant que *S. aureus* a besoin de ses grands régulateurs majeurs (système *agr*, opéron *sigB*, *arlR* et *sarR*) pour sa croissance en coculture. En lien avec le métabolisme des acides aminés et des purines, une possible déplétion en glucose du milieu causée par *P. aeruginosa* pourrait expliquer le caractère essentiel de ces gènes, nécessaire à l'adaptation de *S. aureus* dans ces conditions. Ces résultats sont intéressants car l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est appauvri en glucose (Kirchner et al., 2012).

**NorK est une nouvelle pompe à efflux impliquée dans
la résistance à la norfloxacine chez *Staphylococcus
aureus***

**NorK is a new antibiotic efflux pump involved in norfloxacin resistance in
Staphylococcus aureus.**

Short article submitted in Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Paul Briaud, Jessica Baude, Bastien Sylvère, Laura Camus, François Vandenesch, and
Moreau Karen.

Résultats expérimentaux

Introduction

Les antibiotiques sont le traitement le plus efficace pour contrôler et diminuer la mortalité associée aux infections bactériennes. Cependant leur grand succès thérapeutique est entaché par l'acquisition de phénomène de résistance, apparaissant très souvent seulement quelques années après leur introduction en santé humaine (Davies and Davies, 2010). La survenue de bactéries multi-résistantes appelées aussi « superbugs », met la lutte contre ces phénomènes de résistances et la découverte de nouvelles molécules anti-bactériennes au centre des préoccupations que nous devons surmonter pendant le 21^{ème} siècle. Un des plus importants problèmes chez les patients CF est l'acquisition de souches bactériennes multi-résistantes de *P. aeruginosa* (MDR) et la proportion croissante des clones MRSA de *S. aureus* (Stefani et al., 2017). D'après le registre annuel américain 2014 de la mucoviscidose, 30% des patients sont colonisés par des clones MRSA et 20% sont porteurs d'isolat MDR *P. aeruginosa* (Cystic Fibrosis Foundation, 2014).

La résistance aux antibiotiques est possible grâce à différents mécanismes mis en place par la bactérie : altération/protection de la cible de l'antibiotique, inactivation/dégradation, diminution de la perméabilité de la membrane aux antibiotiques et réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par des mécanismes actifs d'efflux (Foster, 2017). Les pompes à efflux sont des protéines membranaires impliquées dans l'export de composés toxiques tels que des antibiotiques ou des métaux. Une 20aine de pompes à efflux a été prédite chez *S. aureus* et une 15aine déjà caractérisées (Schindler et al., 2015). Certaines de ces pompes sont spécifiques d'un antibiotique et d'autres prennent en charge plusieurs antibiotiques différents (multidrug efflux pumps).

Les analyses bio-informatiques menées par Sylvère Bastien sur nos données RNA-seq (cf article n°1) ont mené à l'identification d'une potentielle nouvelle pompe à efflux de la famille *nor* de *S. aureus*, que nous avons appelées *norK*. Les pompes *nor*, au nombre de 5 actuellement décrites (NorA, NorB, NorC, NorD et Tet38) font partie de la famille des MFS (major facilitator superfamily). Ces pompes sont composées de 12 à 14 domaines transmembranaires et participent à l'export des fluoroquinolones (e.g ciprofloxacine, norfloxacine, sparfloxacine), du bromure d'éthidium et de la tétracycline par un phénomène actif dépendant du gradient de proton H⁺ (Jang, 2016). L'étude décrite ici a été menée pour caractériser cette nouvelle pompe à efflux chez *S.*

Résultats expérimentaux

aureus et permettre ainsi d'améliorer la connaissance sur les mécanismes de résistance par efflux aux antibiotiques.

Les analyses phylogénétiques ont révélé que la pompe *norK* se retrouve au sein du cluster formé par les pompes *norC* et *norB*. De plus l'alignement des séquences protéiques de cette pompe avec NorB et NorC a montré une organisation typique des « multidrugs efflux pumps » de la famille MFS avec 14 domaines transmembranaires prédites. Une souche de *S. aureus* RN6390 surexprimant *norK* a été capable d'exporter le bromure d'éthidium, indiquant alors que ce gène code bien pour une pompe à efflux. La survie améliorée en présence de concentration croissante de norfloxacine a démontré l'implication de cette pompe dans la résistance à cet antibiotique. Finalement, l'étude de l'expression de *norK* dans des souches de laboratoires (SF8300, LAC, Newman, N315 et RN6390) a montré un niveau d'expression comparable aux autres gènes *nor*. Néanmoins, l'absence de régulation par MgrA, régulateur majeur des gènes *nor*, implique une régulation indépendante de cette pompe.

Pour conclure, ce projet a permis de découvrir et de caractériser une nouvelle pompe à efflux aux antibiotiques impliquée dans l'export de norfloxacine. L'implication de cette nouvelle pompe dans la physiologie des infections à *S. aureus* nécessitera des études plus approfondies.

1 NorK, a novel norfloxacin efflux pump in *Staphylococcus aureus*

2

3 Paul Briaud^a, Jessica Baude^a, Sylvère Bastien^a, Laura Camus^a, François Vandenesch^{a,b} and Karen
4 Moreau^{a,#}.

5

6 ^aCIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Université Lyon1, Ecole
7 Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR5308, Lyon, France

8 ^b Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

9

10 Running title: New efflux pump in *S. aureus*

11

12 # Address correspondence to Karen Moreau, karen.moreau@univ-lyon1.fr

13

14

15 **Abstract**

16 A novel efflux pump similar to Nor efflux pumps and designated as NorK was identified in
17 *Staphylococcus aureus*. It contributes to norfloxacin resistance and presents a high level of
18 expression in different strains. Its expression is not regulated by MgrA, unlike other genes of the
19 *nor* gene family, suggesting that NorK could be important in the absence of expression of other
20 *nor* genes.

21

22 *Staphylococcus aureus* is a major opportunistic bacterial pathogen responsible for a
23 variety of diseases (1). Its success in causing life-threatening infections is due to its considerable
24 production of toxins and ability to develop resistance to a wide spectrum of antibacterial
25 compounds (2, 3). Various systems have been developed by *S. aureus* to make it resistant to these
26 substances, such as the alteration of drug binding sites, drug inactivation and the involvement of
27 efflux pumps.

28 The term multidrug resistance (MDR) pumps refers to numerous efflux pumps that are
29 classified into two major groups: (i) ABC-type transporters, which utilize ATP hydrolysis to extrude
30 target drugs, and (ii) secondary multidrug transporters, which exploit proton and sodium
31 gradients as energy sources. Among this latter group, the major facilitator superfamily (MFS) has
32 been studied extensively in staphylococcal species. In *S. aureus*, the Nor protein family belongs
33 to the MFS and can extrude a broad range of antibiotic substances such as the fluoroquinolones
34 (FQ), norfloxacin and ciprofloxacin. Four different pumps involved in FQ resistance have been
35 described previously (4–7). NorA and NorB are responsible for a relatively high-level of resistance
36 to hydrophobic quinolones, whereas NorC seems to be involved in a low-level of resistance (6).
37 The NorD substrates remain to be discovered.

38 Here, we report a new chromosomally encoded Nor protein called NorK, which is highly
39 expressed independently of MgrA regulation and involved in norfloxacin resistance.

40 **Identification of a new putative efflux pump.** In a previous study (Briaud et al., 2019), we
41 identified 4 different *nor* related genes from RNA sequencing data, using *S. aureus* NCTC8325 as
42 a reference genome (GenBank CP000253). Three of them have already been described: *norB*
43 (SAOUHSC_01448), *norC* (SAOUHSC_00058) and *norD* (SAOUHSC_02762). The last gene

44 SAOUHSC_02740 was encoded for an unknown protein and annotated as a putative drug
45 transporter. The so-called *norK* gene is 1.401 nucleotides long (Fig. S1) and encodes for a
46 hypothetical protein of 466 amino acids. This protein shares relatively high homology with NorB
47 (57% identity and 76% similarity) and NorC (59% identity and 74% similarity) but low homology
48 with the NorA and NorD pumps (16% identity and 34% similarity with NorA, 16% identity and 39%
49 similarity with NorD). A phylogenetic analysis was conducted on Nor proteins and major
50 chromosomally encoded MFS efflux pumps from *S. aureus* NCTC8325 using ClustalW alignment
51 and the Maximum Likelihood method. As depicted by the cluster formed by both proteins (Fig.1),
52 NorK is closely related to NorB and NorC. ClustalW alignment of NorK with NorB and NorC
53 proteins revealed that highly conserved domains were shared (Fig.2). Moreover, the NorK protein
54 presented 14 transmembrane domains predicted by the Phyre2 web portal (8), similar to those
55 observed in the NorB and NorC pumps. Together these data suggest that NorK belongs to the
56 same family as the Nor proteins previously described. To assess if this pump was widely
57 distributed among *S. aureus*, BLAST analysis on a large collection of genotypically diverse
58 bacteremia isolates (9) was performed. The results showed that 98% (123/126) harbor *norK* genes
59 (identity and coverage >90%).

60 The expression of *norK* genes was explored by RT-qPCR (protocol in supplementary data) on 5
61 different laboratory strains of *S. aureus* and compared to *norA*, *B*, *C* and *D* gene expressions. The
62 *norK* transcript was consistently detected in all the strains tested at a level similar to *norA* and
63 *norD* genes (Fig. 3 and S2), supporting functionality.

64 MgrA can act as a repressor or an activator of *norA*, *norB* and *norC* genes (5–7) depending on the
65 RsbU strain background and as a result of its phosphorylation state (22). We thus explored *norK*

66 gene expression in the Newman wild-type (WT, rsbU+) and the Newman $\Delta mgrA$ strain (11). *mgrA*
67 deletion had no impact on *norK* expression while increased *norA* and *norC* and decreased *norB*
68 expression were observed as expected for a RsbU positive background (Fig. 4) (10, 12).

69 **NorK efflux activity and involvement in antibiotic resistance.** To assess the functionality of NorK,
70 thus its efflux activity, an overexpressing *S. aureus* strain was built (protocol in supplementary
71 data) and an ethidium bromide efflux assay was performed as previously described (13). The rate
72 of fluorescent loss in *norK*-overexpressing strains was significantly higher compared to the WT
73 strain (Fig. 5). Antibiotic efflux was tested by time-kill assay in the presence of a representative
74 anti-staphylococcal fluoroquinolone, norfloxacin, as previously described (14). Wild-type and
75 *norK*-overexpressing strains were cultivated for 8 hours in Mueller-Hinton broth supplemented
76 with norfloxacin at $\frac{1}{2}$ MIC (0.19 μ g/mL), MIC (0.38 μ g/mL) and 2MIC (0.76 μ g/mL). At 2, 4, 6 and 8
77 hours, bacteria were enumerated by plating on TSA. The survival rates of the *norK*-overexpressing
78 strain were significantly higher (between 0.5 log and 1 log CFU/ml) than those for the WT strain.

79 In conclusion, NorK is a new member of the *nor* gene family and contributes to *S. aureus*
80 norfloxacin resistance. NorK is widely distributed within *S. aureus* strains and its high level of
81 expression may point to an important role in antibiotic resistance and fitness during the
82 colonization of infectious niches. Moreover, the MgrA-independent regulation of *norK* indicates
83 that its expression could be induced even though other *nor*-regulated genes were not expressed.
84 Further studies will be necessary to explore the expression profiles of *nor* genes in different
85 conditions (e.g., antibiotic stresses, infectious niches).

86

87

88 **Acknowledgments.**

89 This work was funded by Inserm. P. Briaud was funded by the French Ministry of Education and
90 Research, and L. Camus was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant number
91 ECO20170637499).

92 **Authors' contributions:**

93 PB, JB, LC, FV and KM contributed to the design of the study. PB and JB conducted the
94 experiments. SB conducted and analyzed all the bioinformatics works. PB and KM collected the
95 data and wrote the first draft of the manuscript. All the authors contributed to manuscript
96 revision and approved the submitted version.

97 None of the authors have any conflict of interest to report.

98

99 **References**

- 100 1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. Staphylococcus aureus
101 Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin
102 Microbiol Rev 28:603–661.
- 103 2. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2015.
104 Differential expression and roles of Staphylococcus aureus virulence determinants during
105 colonization and disease. mBio 6:e02272-02214.
- 106 3. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in
107 Staphylococcus aureus. Future Microbiol 2:323–334.
- 108 4. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of
109 Staphylococcus aureus is a multidrug efflux transporter. Antimicrob Agents Chemother
110 37:128–129.
- 111 5. Truong-Bolduc QC, Hooper DC. 2010. Phosphorylation of MgrA and its effect on expression
112 of the NorA and NorB efflux pumps of Staphylococcus aureus. J Bacteriol 192:2525–2534.
- 113 6. Truong-Bolduc QC, Strahilevitz J, Hooper DC. 2006. NorC, a New Efflux Pump Regulated by
114 MgrA of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 50:1104–1107.
- 115 7. Ding Y, Fu Y, Lee JC, Hooper DC. 2012. Staphylococcus aureus NorD, a Putative Efflux Pump
116 Coregulated with the Opp1 Oligopeptide Permease, Contributes Selectively to Fitness In
117 Vivo. J Bacteriol 194:6586–6593.

- 118 8. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for
119 protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858.
- 120 9. Bouchiat C, Moreau K, Devillard S, Rasigade J-P, Mosnier A, Geissmann T, Bes M, Tristan A,
121 Lina G, Laurent F, Piroth L, Aissa N, Duval X, Le Moing V, Vandenesch F, Chirouze C, Curlier E,
122 Descottes-Genon C, Hoen B, Patry I, Vettoretti L, Chavanet P, Eicher J-C, Gohier-Treuelot S,
123 Greusard M-C, Neuwirth C, Péchinot A, Piroth L, Célard M, Cornu C, Delahaye F, Hadid M,
124 Rausch P, Coma A, Galtier F, Géraud P, Jean-Pierre H, Le Moing V, Sportouch C, Reynes J,
125 Aissa N, Doco-Lecompte T, Goehringer F, Keil N, Letranchant L, Malela H, May T, Selton-Suty
126 C, Bedos N, Lavigne J-P, Lechiche C, Sotto A, Duval X, Habensus EI, lung B, Leport C, Longuet
127 P, Ruimy R, Bellissant E, Donnio P-Y, Le Gac F, Michelet C, Revest M, Tattevin P, Thebault E,
128 Alla F, Braquet P, Erpelding M-L, Minary L, Tubiana S, Bès M, Etienne J, Tristan A,
129 Vandenesch F, Barbas S, Delonca C, Sussmuth V, Verchère A. 2015. *Staphylococcus aureus*
130 infective endocarditis versus bacteremia strains: Subtle genetic differences at stake. *Infect*
131 *Genet Evol* 36:524–530.
- 132 10. Truong-Bolduc QC, Ding Y, Hooper DC. 2008. Posttranslational Modification Influences the
133 Effects of MgrA on norA Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 190:7375–7381.
- 134 11. Crosby HA, Schlievert PM, Merriman JA, King JM, Salgado-Pabón W, Horswill AR. 2016. The
135 *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by
136 Controlling Surface Protein Expression. *PLoS Pathog* 12.
- 137 12. Luong TT, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Lee CY. 2006. Transcription Profiling of the
138 mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188:1899–1910.

139 13. Khan IA, Mirza ZM, Kumar A, Verma V, Qazi GN. 2006. Piperine, a Phytochemical Potentiator
140 of Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:810–812.

141 14. Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, Khan IA. 2012. Capsaicin, a
142 novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus*
143 *aureus*. *J Antimicrob Chemother* 67:2401–2408.

144

145

146

147

148

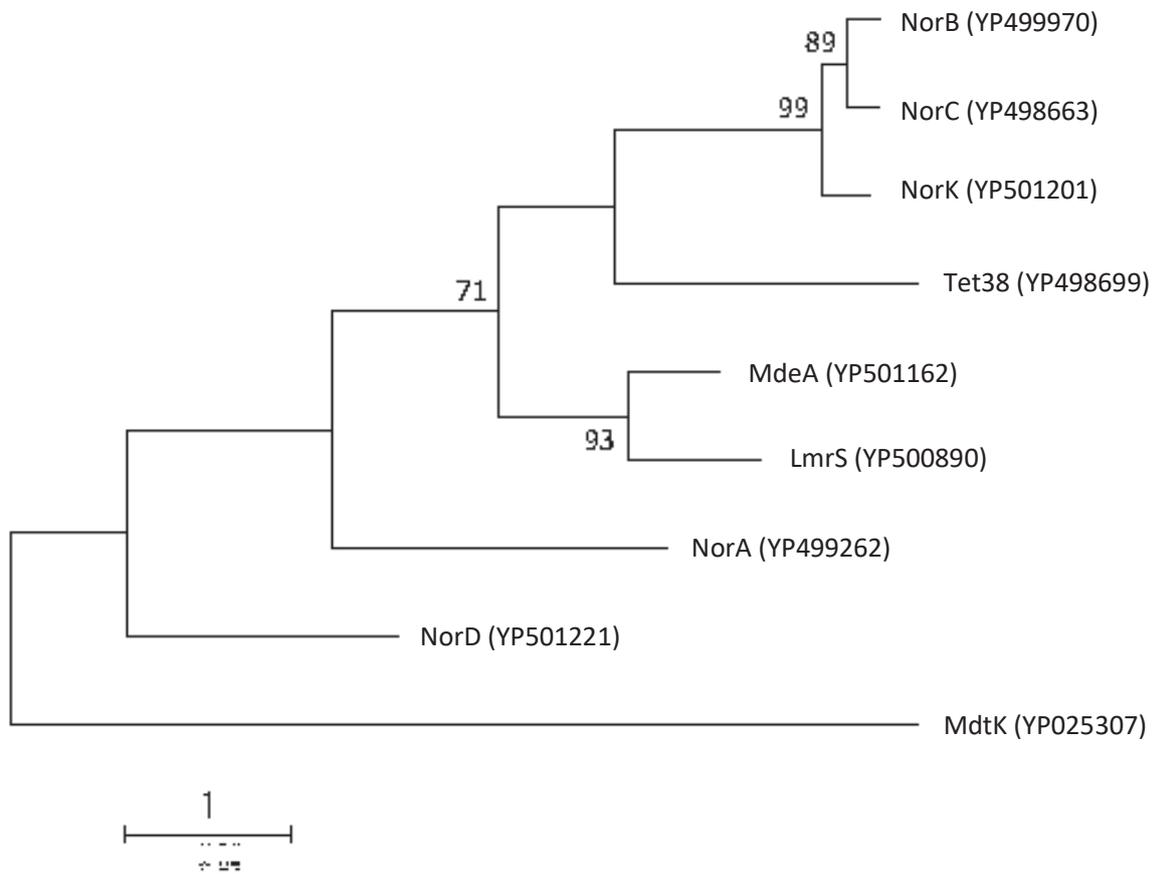


FIG. 1. Phylogenetic tree of *S. aureus* chromosomally encoded major MFS efflux pumps. Accession numbers from the *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 strain are indicated in parentheses. Proteic sequences were aligned by the ClustalW method and the tree was built using the Maximum Likelihood method based on the Le Gascuel 2008 model (14) with a bootstrap of 10000. The tree with the highest log likelihood (-7115.58) is shown. The percentage of trees (>70) in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The Multi-Antimicrobial Extrusion Protein (MATE) MdtK sequences from *E. coli* (KAB2830459) was used to root the tree.

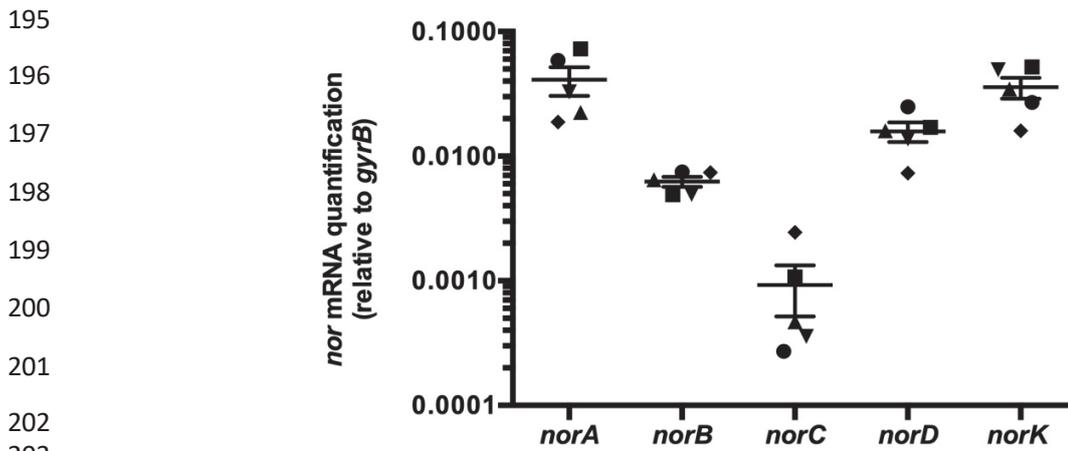
```

149 NorB      1 MEKPSREAFEGNNKLLIGIVLSVITFWLFAQSLVNVP ILEDSFNTDIGTVNIAVSITAL
150 NorC      1 MN----ETYRGGNKLI LGIVLGVITFWLFAQSLVNVP NLQQSFQTDMTISIAVSLTAL
151 NorK      1 MDT--SKQFRGDNRLLLGIVLGVITFWLFAQSLVNLV VPLQSTYSSDVTGTINIAVSLSAL
152 consensus 1 Me     e frG NkLllGIVLgVITFWLFAQSLVNvVp Lq sf tDiGTinIAVSlTAL
153
154 NorB      61 FSGMFVVGAGGLADKYGR IKLTNIGIILNIGSLLIIISNIP LLLIIGRLIQGLSAACIM
155 NorC      57 FSGMFVVGAGGLADKIGRVKMTNIGLLSIIIGSALIIITNLPALLIIGRVIQGVSAACIM
156 NorK      59 FAGLFIVGAGDVADKFRVKITYVGLILNVVGSLLIIITPLPAFLIIGRIIQGLSAACIM
157 consensus 61 FsGmFvVGAGglADKyGRvKlTniGliLnlIGSLLIIItnlPalLiIGRIIQGLSAACIM
158
159 NorB      121 PATLSIIKSYIIGKDRQRALSYWSIGSWGGSVCSFFGGAVATLLGWRWIFILSIIISLI
160 NorC      117 PSTLAIMKTYIYQGAERQRALSYWSIGSWGGSIGCSLFGGAVATTMGWRWIFIFSIIVAVL
161 NorK      119 PSTLAIINEYYIGTRRQRALSYWSIGSWGGSIGCTLFGGLMATYIIGWRISIFVVSILLTLL
162 consensus 121 PsTLaiIksYYiG dRQRALSYWSIGSWGGSiCsLFGGavAT lGWRwIFilSIIisll
163
164 NorB      181 ALFLIKGTPETKSKSI-----SLNKFDIKGLVLLVIMLLSLNLIITKGS ELGVTSLLFIT
165 NorC      177 SMLLIKGTPETKSEIT-----NTHKFDVAGLIVLVMLLSLNVVITKGAALGYTSLWFFG
166 NorK      179 AMYLIKHPETKAEPiKGMKAEAKKFDVIGLVLVVTMLSLNVIITQTSHFGLVSPILIG
167 consensus 181 amfLIKgtPETKse i          hKFDv GLvlLVvmlLSLNVlITkgs lGvtSlIfig
168
169 NorB      236 LLAIAGSFSLSFIVLEKRATNPLIDFKLFKNKAYTGATASNFLNGVAG-TLIVANTFVQ
170 NorC      232 LIAIVIVAFFIFLNVKVDNPLIDFKLFENKPYTGATISNFLNGFAG-TLIVANTFVQ
171 NorK      239 LIVVFICSLVGFVYYENKIKHPLVDFSIFKNRGYSGATISNFLNGVAGGALIVINTYYQ
172 consensus 241 Liai I sf lFi lEkkv nPLiDfklFkNkaYtGATiSNFLNGvAG tLIVaNTfvQ
173
174 NorB      295 RGLGYSSLQAGLSITYLVMVLIMIRVGEKLLQTLGCKKPM LIGTVLIVGEC LISLTF L
175 NorC      291 QGLGYTALQAGYLSITYLIMVLLMIRVGEKLLQKMGSKRPMLLGT FIVVIGIALISLVFL
176 NorK      299 QQLGFNSSQTYISLTYLITVLSMIRVGEKILSQHGPKRPLLLGSGFTVIGLILLSLTF L
177 consensus 301 qgLGysslQaGylSiTYLimVliMIRVGEKlLq lG KrPmLlGtgvlviGi LiSLtFL
178
179 NorB      355 PEIFYVICCIIGYLF FGLGLGIYATPSTDTAIANAPLEKVGVAAGIYKMASALGGAFGVA
180 NorC      351 PGIFYVISCVVGYLCFGLGLGIYATPSTDTAISNAPLDKVGVASGIYKMASSLGGAFGVA
181 NorK      359 PEVWYIISIVGYLLFGTGLGLYATPSTDTAVASAPDDKSGVASGVYKMASSLGNAFGVA
182 consensus 361 PeifYvIscivGYL FGlGLGiYATPSTDTAianAPldKvGVAsGiYKMASSLGgAFGVA
183
184 NorB      415 LSGAVYAIVSNMNIYTGAMI ALWLNAGMGLSFV IILLVVPKQNDTQL----
185 NorC      411 LSGAVYAGAVAATS IHTGAMI ALWVNVLMGIMAFIAILFAIPN-DDKRVKDAK
186 NorK      419 VSGTVYTVLAAANLNLGFTGMFNALLAIVAFVLVILLVVPK-NQTN----L
187 consensus 421 LSGaVYaiv a tni tGamialwlNalmgIlaFviILLlvPk ndtql
188
189

```

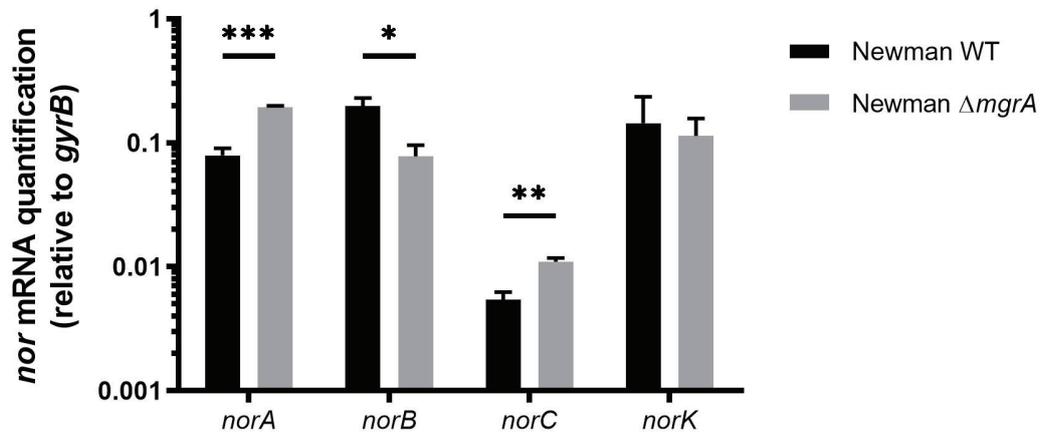
190 FIG. 2. Amino acid sequence alignments of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 NorB (YP 499970),
191 NorC (YP 498663) and NorK (YP 501210) proteins. Alignment was done using ClustalW. Identical
192 amino acids are shown in red, similar amino acids in blue. Grey boxes represent predicted
193 transmembrane domains by Phyre2 web portal (8).

194



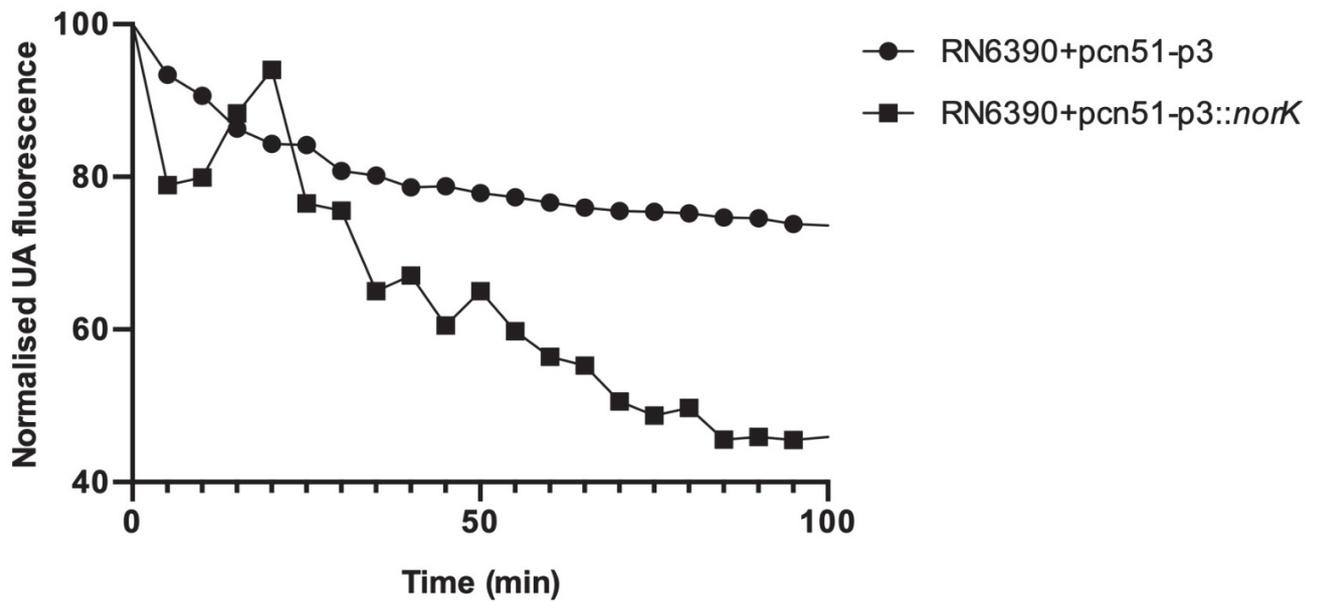
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205 FIG. 3. *nor* genes expression. *S. aureus* strains RN6390● (14), HG001▼ (15), SH1000■ (16),
206 Newman◆ (16), SF8300▲ (17), were cultivated in BHI for 8 hours at 37°C with shaking (200rpm).
207 At 4 hours of culture, RNAs were extracted and *nor* gene expression was monitored by RT-qPCR.
208 The results are represented as the mean +/- standard error. Quantification after 2, 6 and 8
209 hours of culture are presented in figure S2
210

211



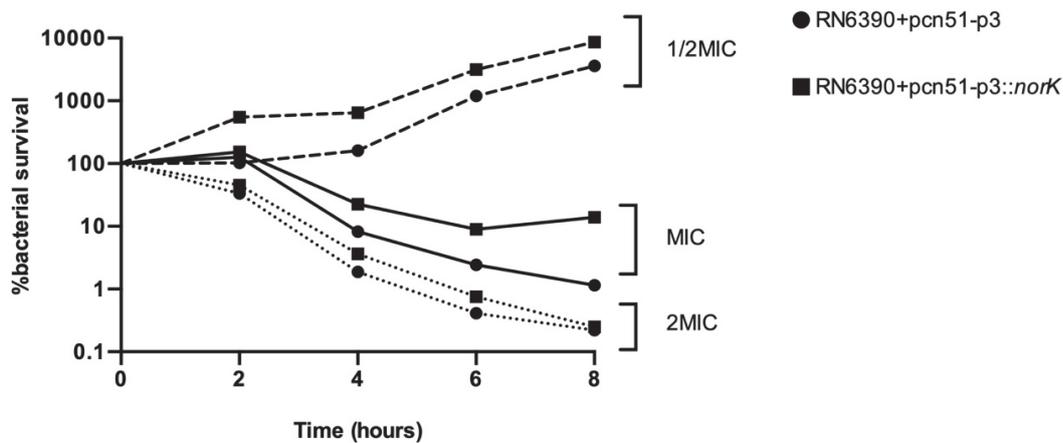
212 FIG. 4. MgrA regulation of *nor* gene expression. Newman wild-type (black) and Newman $\Delta mgrA$
213 (grey) strains were cultivated in BHI at 37°C for 8 hours. At 4 hours of culture, RNAs were extracted
214 and *nor* gene expression was monitored by RT-qPCR. The results are depicted as mean + standard
215 error from three independent experiments. Statistical analyses were performed by using an
216 unpaired t-test (* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

217



218
219 FIG. 5. Quantification of ethidium bromide efflux over time by *S. aureus* RN6390 WT (●) and *norK*
220 overexpressing (■) strains. Bacteria were resuspended in efflux buffer with EtBr (2µg/mL) and
221 reserpine (25µg/mL), to prevent efflux. After 30min, bacteria were washed to remove reserpine
222 and EtBr efflux was monitored by measuring the decrease of fluorescence. One experiment
223 representative of three independent experiments is depicted.

224
225



226
227 FIG. 6. Time–kill curves of *S. aureus* RN6390 WT (●) and *norK* overexpressing (■) strains. Bacteria
228 were grown in Mueller-Hinton broth (MHB) for 8 hours. Bacteria were resuspended at 1.10^6
229 CFU/mL in MHB supplemented with norfloxacin at $\frac{1}{2}$ MIC ($0.19\mu\text{g}/\text{mL}$), MIC ($0.38\mu\text{g}/\text{mL}$) and 2MIC
230 ($0.76\mu\text{g}/\text{mL}$). Bacteria were plated on MHA every two hours to count living cells. The results are
231 indicated as the percentage of survival rate calculated by dividing the number of bacteria at a
232 time point by the number of bacteria at T0. One experiment representative of three independent
233 experiments is depicted.

234

IV. Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Résumé des résultats

L'état de coexistence n'a été que peu étudié jusqu'à présent et seulement quelques informations dans le contexte de la mucoviscidose sont décrites (Baldan et al., 2014; Cigana et al., 2017; Michelsen et al., 2014, 2016). Ainsi, la coexistence avec *P. aeruginosa* est responsable d'une augmentation de la résistance à la tobramycine, gentamycine et ciprofloxacine chez *S. aureus* bien que le mécanisme responsable soit inconnu (Michelsen et al., 2014, 2016). Le but de ma thèse a donc été de caractériser l'impact de *P. aeruginosa* sur *S. aureus*. Plusieurs approches ont été entreprises, notamment (i) une approche transcriptomique par RNA-seq et RT-qPCR, (ii) une recherche des gènes essentiels de *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa* par TN-seq et enfin, (iii) une étude clinique pour étudier l'impact de l'interaction bactérienne sur l'état de santé des patients. L'approche transcriptomique a montré une surexpression des gènes *tet38*, *norA* et *norC*, impliqués dans l'internalisation en cellules épithéliales pulmonaires ainsi que dans la résistance à la tétracycline et aux quinolones (Fournier et al., 2000; Truong-Bolduc et al., 2005, 2006). De plus, le signal responsable de ces dérégulations semble être spécifique à *P. aeruginosa* et nécessite un contact rapproché entre les deux bactéries. Les données de TN-seq indiquent qu'en coexistence, le quorum-sensing (système *agr*), la réponse aux stress (régulon *sigB*) et le métabolisme des purines (*pur/deoB*) sont essentiels à la coexistence avec *P. aeruginosa*. Ces gènes ont un rôle dans l'adaptation à l'environnement, la résistance et la virulence de *S. aureus* (Bischoff et al., 2001; Le and Otto, 2015; Li et al., 2018; Tuchscher et al., 2015). Ces données, couplées aux résultats du RNA-seq, laissent penser à un effet synergique entre les deux bactéries sur la virulence de *S. aureus* et son adaptation à l'environnement pulmonaire. Une étude rétrospective clinique en partenariat avec les HCL a été conduite pour évaluer l'impact de la co-infection et de l'interaction *S. aureus/P. aeruginosa* sur l'état de santé des patients CF. Dans la littérature, des données contradictoires existent sur l'impact de la co-infection et aucune étude n'a pris en compte les effets des interactions bactériennes. Nos résultats montrent que la co-infection *S. aureus/P. aeruginosa* est plus sévère qu'une infection par *S. aureus* seul, mais cette co-infection est aussi sévère qu'une mono-infection par *P. aeruginosa*. Les patients infectés par des couples *S. aureus/P. aeruginosa* en compétition présentent une FEV1% plus basse que les personnes mono-infectées par *S. aureus*. Cependant, les personnes infectées par un couple *S. aureus/P. aeruginosa* en coexistence montrent

Discussion et perspectives

un nombre de jours d'hospitalisation supérieur. L'ensemble des données obtenues ouvrent de nombreuses perspectives d'étude.

IV.1. L'implication du système *agr* dans la coexistence avec *Pseudomonas aeruginosa*

La liste de gènes dressée par l'analyse Tn-seq montre que l'opéron *agr* est essentiel à la coexistence avec *P. aeruginosa*. De plus, la molécule effectrice majeure du système *agr*, RNAIII régule *mgrA*, lui-même important pour la surexpression de *tet38*, *norA* et *norC* en présence de *P. aeruginosa* observée dans notre analyse RNAseq. Ces deux éléments convergents nous ont conduit à explorer le système *agr* en présence de *P. aeruginosa*. Dans le but de regarder dans quelle mesure *agr* était important en présence de *P. aeruginosa*, des RT-qPCR ont été effectuées sur les gènes du quorum-sensing en coculture pour regarder leur cinétique d'expression (Figure IV-1). Une diminution de l'expression de RNAIII ainsi que des gènes *agrA* et *agrC* a été observée sur les 12 paires de souches cliniques utilisées dans l'article 1 en coculture avec *P. aeruginosa*. Ces résultats ont été confirmés sur les souches de références LAC et Newman. Ainsi, en présence de *P. aeruginosa*, le système *agr* est sous-exprimé. Néanmoins, ces résultats semblent contredire les données du TN-seq. En effet, nos données indiquent que d'une part, le système *agr* est essentiel à la coexistence mais d'autre part, le quorum-sensing semble être sous-exprimé en coexistence. Une première hypothèse serait qu'en coexistence, la sous-expression du système *agr* induite en coculture permettrait à *P. aeruginosa* de contrôler la population de *S. aureus*. Cependant, lors de nos expériences de cocultures, le suivi de croissance de chaque bactérie a été effectué et aucune différence de concentration bactérienne n'a été notée entre les mono- et cocultures. Il semblerait donc que la sous-expression du quorum-sensing de *S. aureus* ne soit pas un moyen utilisé par *P. aeruginosa* pour impacter négativement la croissance du staphylocoque. Une autre hypothèse serait que l'inactivation totale de *agr* et sa sous-expression n'aient pas le même impact sur la physiologie de *S. aureus*. En effet, l'insertion du transposon dans les gènes du quorum-sensing empêche toute réponse de *S. aureus* à son environnement et donc toute adaptation de l'expression de ses gènes. En revanche, la sous-expression de son quorum-sensing est déjà une réponse à son environnement et autorise l'expression de certains gènes. En coculture, les données de RNA-seq montrent en effet que le métabolisme de *S. aureus* est différent des monocultures (sous-expression des gènes

Discussion et perspectives

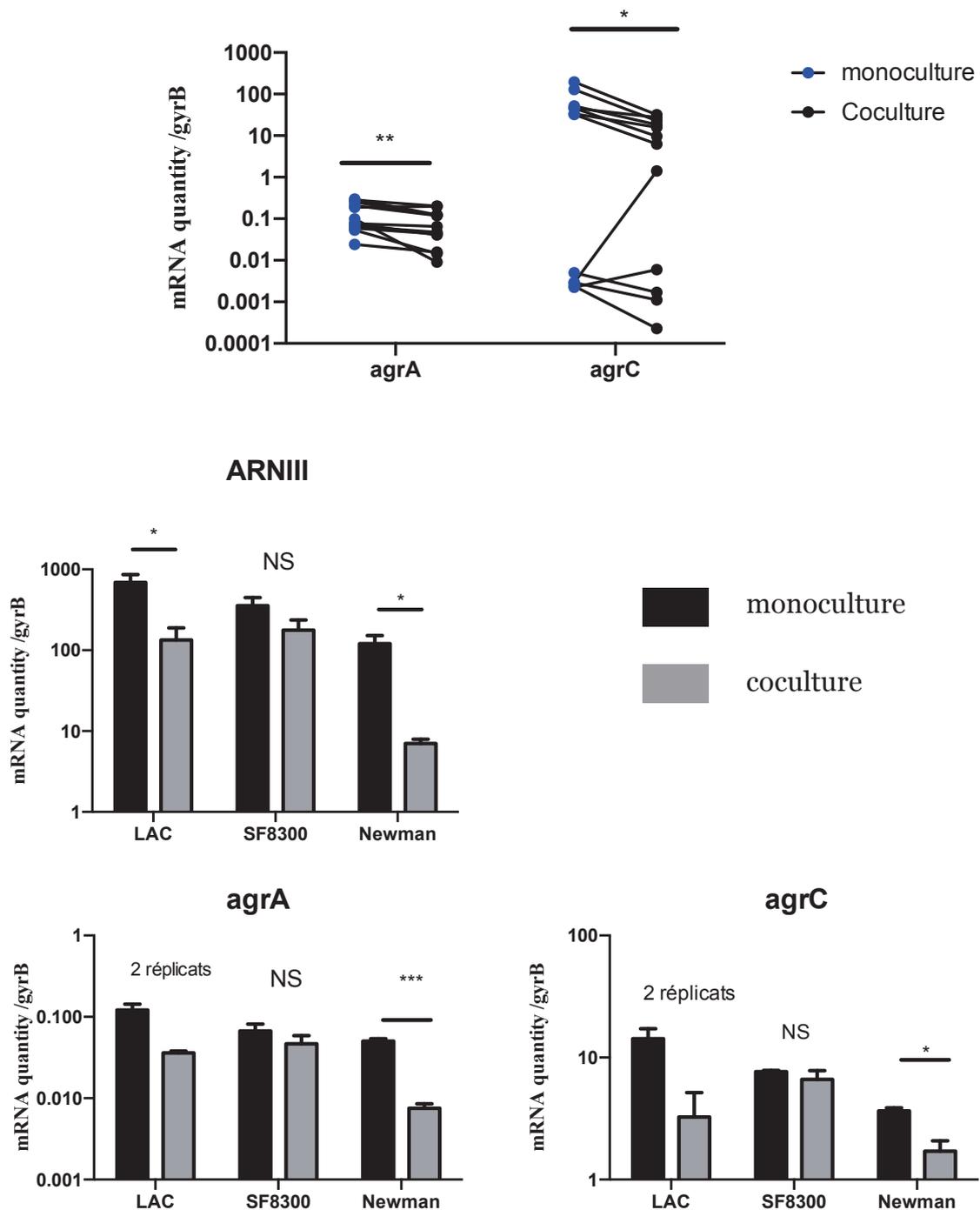


Figure IV-1 : Dérégulation du système agr en coculture avec *P. aeruginosa*. Les 12 couples de souches cliniques (A) de l'article 1 ou les souches de laboratoires (B) LAC, SF8300 et Newman ont été mise en culture dans les mêmes conditions que le RNA-seq. Les ARNs ont été extraits à 4h et des RT-qPCR ont effectué pour mesurer l'expression relative des gènes *agrA*, *agrC* et *RNIII*. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test t apparié pour la figure A et d'un test t non apparié pour la figure B (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Discussion et perspectives

de la glycolyse, surexpression du métabolisme des purines), suggérant une adaptation de l'expression des gènes en présence de *P. aeruginosa*. Un certain niveau d'expression des gènes *agr* pourrait donc être essentiel au maintien de *S. aureus* avec *P. aeruginosa*. Si certains gènes présentent une sous-expression ou une surexpression trop importante, un effet néfaste peut être envisagé sur la coexistence avec *P. aeruginosa*. Des analyses protéiques devront être envisagées pour analyser l'impact de *P. aeruginosa* sur les cibles de Agr et compléter ces observations transcriptomiques

In vivo, cette répression du quorum-sensing chez *S. aureus* amènerait à une surexpression des protéines de surface comme la protéine A, des adhésines, une meilleure production de biofilm, une surexpression des gènes impliqués dans l'échappement au système immunitaire (*sbi*, *coa*) et diminuerait l'expression de facteurs de virulences (*PSM*, *hla*) (Le and Otto, 2015). La sous-expression de *agr* est généralement observée lors d'infections chroniques, tandis qu'une activation du quorum-sensing se produit lors d'infections aiguës, nécessitant la production de toxines pour déstabiliser et détruire les cellules et composantes de la matrice extracellulaire (Le and Otto, 2015). Par conséquent, cette sous-expression en présence de *P. aeruginosa* pourrait favoriser la persistance de *S. aureus* dans les voies aériennes dans un contexte d'infection chronique. Les données de TN-seq montrent également que l'opéron *pur* serait essentiel à la coexistence. La biosynthèse des purines a été décrite comme essentielle au maintien de *S. aureus* dans un modèle d'infection d'endocardites de lapin (Li et al., 2018). Aussi, l'opéron *sigB*, essentiel selon nos données de TN-seq est primordial pour une persistance intracellulaire (Tuchscher et al., 2015). Nos données suggèrent alors que la coexistence avec *P. aeruginosa* orienterait la physiologie de *S. aureus* vers un mode d'infection chronique (diminution de la virulence, augmentation de la survie intracellulaire, échappement au système immunitaire...).

Le signal de *P. aeruginosa* responsable de la modification de l'expression du système *agr* de *S. aureus* devra aussi être investigué. Il peut être direct, par l'effet inhibiteur d'un produit issu de *P. aeruginosa*, ou indirect, issu d'une compétition nutritionnelle et d'un changement de métabolisme de *S. aureus*. Le quorum-sensing est un capteur de la densité bactérienne par la détection des auto-inducteurs produits par les bactéries. Ces auto-inducteurs sont de structures chimiques différentes suivant le type de quorum-sensing dont ils sont issus (AIP pour *S. aureus* et AHLs/PQS pour

Discussion et perspectives

P. aeruginosa). L'un de ces types d'auto-inducteurs, les AI-2, sont issus du système Lux, un autre quorum-sensing partagé par de nombreuses bactéries (Le and Otto, 2015). Ces AI-2 peuvent être détectés par *P. aeruginosa* et *S. aureus*, même si chez ces deux bactéries, le récepteur des AI-2 n'a pas encore été découvert à ce jour. Parmi les gènes hypothétiques essentiels des données du TN-seq, la protéine putative issue du gène *yhht_2* posséderait un domaine appartenant à la superfamille des transporteurs des AI-2. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le gène *yhht_2* code un transporteur d'un autoinducer de type AI-2, qui pourrait avoir un effet sur l'expression du quorum-sensing de *S. aureus*. Pour tester cette hypothèse, nous devons déjà vérifier que la sous-expression du quorum-sensing de *S. aureus* provient d'une molécule sécrétée par *P. aeruginosa*. Des expériences d'expositions de surnageant et de transwell pourront être envisagées. Par la suite, un mutant isogénique du gène *yhht_2* devra être réalisé afin de vérifier que, dans ce mutant, la présence de *P. aeruginosa* n'impacte plus l'expression du quorum-sensing de *S. aureus*. Néanmoins, aucun système LuxS permettant la synthèse des AI-2 n'a été décrit chez *P. aeruginosa* (Duan et al., 2003; Zhao et al., 2010). La recherche de système similaire ou de molécule proches des AI-2 pourra être envisagée chez *P. aeruginosa*. Par ailleurs, la sous-expression du système *agr* en coculture pourrait être due à une inhibition du fonctionnement des AIPs de *S. aureus* tels que cela a déjà été observé chez *Corynebacterium* (Ramsey et al., 2016). Un phénomène identique pourrait se produire dans nos conditions, où *P. aeruginosa* bloquerait la fixation des autoinducers de *S. aureus* à AgrC et induirait donc une sous-expression du quorum-sensing

D'autres facteurs, et notamment environnementaux, sont capables d'influencer l'expression du système *agr* tels que la concentration en glucose ou le pH (Regassa and Betley, 1992; Regassa et al., 1992). Il a ainsi été montré qu'à forte concentration (0,1M), le glucose inhibait l'expression du quorum-sensing de *S. aureus*. Néanmoins, cette concentration est loin de nos conditions expérimentales où nous atteignons au maximum 5mM de glucose. La concentration en glucose ne peut donc pas expliquer la répression du quorum-sensing de *S. aureus* observés en coculture. Le pH extracellulaire possède un effet sur l'expression du système *agr*. Il a été montré qu'un pH alcalin (pH \geq 8) inhibait fortement l'expression de l'ARNIII (Regassa and Betley, 1992) chez *S. aureus*. Une alcalinisation du milieu dû à la présence de *P. aeruginosa* pourrait donc induire la diminution de l'expression du système *agr*. Dans le but de démontrer cela, le pH de monoculture de *S. aureus* ou de coculture avec *P. aeruginosa* a été mesuré

Discussion et perspectives

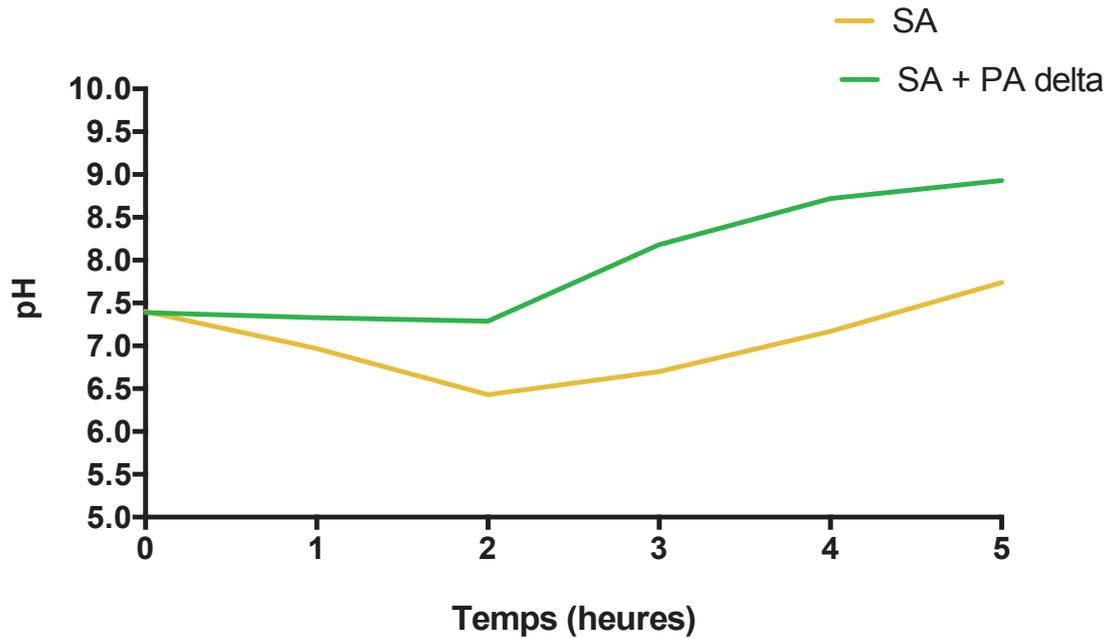


Figure IV-3 : Variation du pH en mono- ou coculture. Les cultures ont été préparées comme indiquées dans le matériel et méthode de l'article 1. Les surnageants des cultures ont été récupérés et le pH mesuré (Laura Camus, doctorante).

pendant 5h (**Figure IV-2**). En monoculture, le pH du surnageant de *S. aureus* atteint un minimum à pH=6,5 à 2h de culture puis remonte à pH=7,7 au bout de 5h. En coculture, une cinétique différente apparaît. En effet, le pH reste stable à une valeur de 7,5 les 2 premières heures puis augmente pour atteindre pH=9 à la fin de l'expérience. A 4h, temps où les RT-qPCR ont été réalisées, le pH atteint 8,5 et pourrait être suffisant pour inhiber l'expression des gènes du quorum-sensing de *S. aureus*. On ne peut donc pas exclure que l'inhibition du quorum-sensing soit dû à l'alcalinisation du milieu par *P. aeruginosa*. Pour démontrer cet effet du pH, un suivi d'expression des gènes *agr* en coculture dans un milieu tamponné devra être réalisé. *In vivo*, une étude très récente a montré que le pH de l'ASL des patients CF n'était pas différent de celui de personnes non-CF (pH=7) (Schultz et al., 2017). Une alcalinisation locale de l'ASL pourrait toutefois se produire dans les zones profondes des poumons où *S. aureus* et *P. aeruginosa* se retrouvent (Hogan et al., 2016; Wakeman et al., 2016). Une étude plus approfondie sur l'effet alcalinisant de *P. aeruginosa* sur *S. aureus* dans des conditions plus proches est donc nécessaire. L'utilisation d'un milieu mimant le mucus de patients CF (Fung et al., 2010) ou encore, des cultures faites directement dans le crachat de

Discussion et perspectives

patients CF (Palmer et al., 2005) permettraient de tester cet effet sur le quorum-sensing.

IV.2. Purine, Tet38 et *Pseudomonas aeruginosa*

En croisant les données du RNA-seq de l'étude 1 et les données du Tn-seq de l'étude 3, nous avons identifié des gènes essentiels à la coexistence et impliqués dans le métabolisme des ribonucléotides, et en particulier les ribonucléotides à base purines (ADP/ATP et GDP/GTP). Lors de la coculture avec *P. aeruginosa*, une surexpression de *deoD* a été observée. Ce gène impliqué dans la voie de recyclage des nucléotides à base purine (Nordlund and Reichard, 2006) permet la synthèse de GMP, AMP ou IMP à partir des bases nucléiques guanine, adénine ou hypoxanthine provenant soit de son propre environnement ou soit du milieu extracellulaire (Figure IV-3)(G. Ducati et al., 2011). La surexpression de la voie de recyclage des nucléotides en présence de *P. aeruginosa* a déjà été observée par une autre équipe (Tognon et al., 2019). De plus, une sous-expression de l'opéron *nrd* codant les ribonucléotides réductases (RNRs ; *nrdI/nrdE/nrdF/nrdG*) se produit en coculture. Ces RNRs sont en charge de la transformation des ribonucléotides (GDP/GTP ou ADP/ATP) en déoxy-ribonucléotides (dGDP/dGTP ou dADP/dATP) (Figure IV-3). Une diminution de la production de déoxy-nucléotides phosphatés se produit en faveur d'une accumulation de nucléotides phosphatés (Figure IV-3). Enfin, les données de TN-seq indiquent que le gène *deoB* et les gènes *purF/purS/purH/purD* sont essentiels à la coexistence. Les gènes *pur* sont tous impliqués dans la synthèse *de novo* de nucléotides à base purine dont le produit final est l'IMP, produit à partir de phosphoribosypyrophosphate (PRPP) lui-même issu de la conversion de D-ribose-1P par DeoB. L'IMP peut être converti en GMP ou en AMP. Le caractère essentiel des gènes *pur/deoB*, la surexpression de *deoD* et la sous-expression des gènes codant les RNRs suggèrent que la synthèse des ribonucléotides par la voie *de novo* ou la voie de recyclage est importante dans l'interaction de coexistence avec *P. aeruginosa*. Il faudrait néanmoins déterminer les raisons pour lesquelles cette synthèse est favorisée lors de cocultures. Nous pouvons envisager qu'une accumulation du pool intracellulaire de ribonucléotides se produit (Figure IV-3), permettant alors d'améliorer la transcription et les réactions dépendantes d'énergie en rendant plus disponibles les nucléotides triphosphates (GTP/ATP). Afin de tester ces hypothèses, des RT-qPCR devront être

Discussion et perspectives

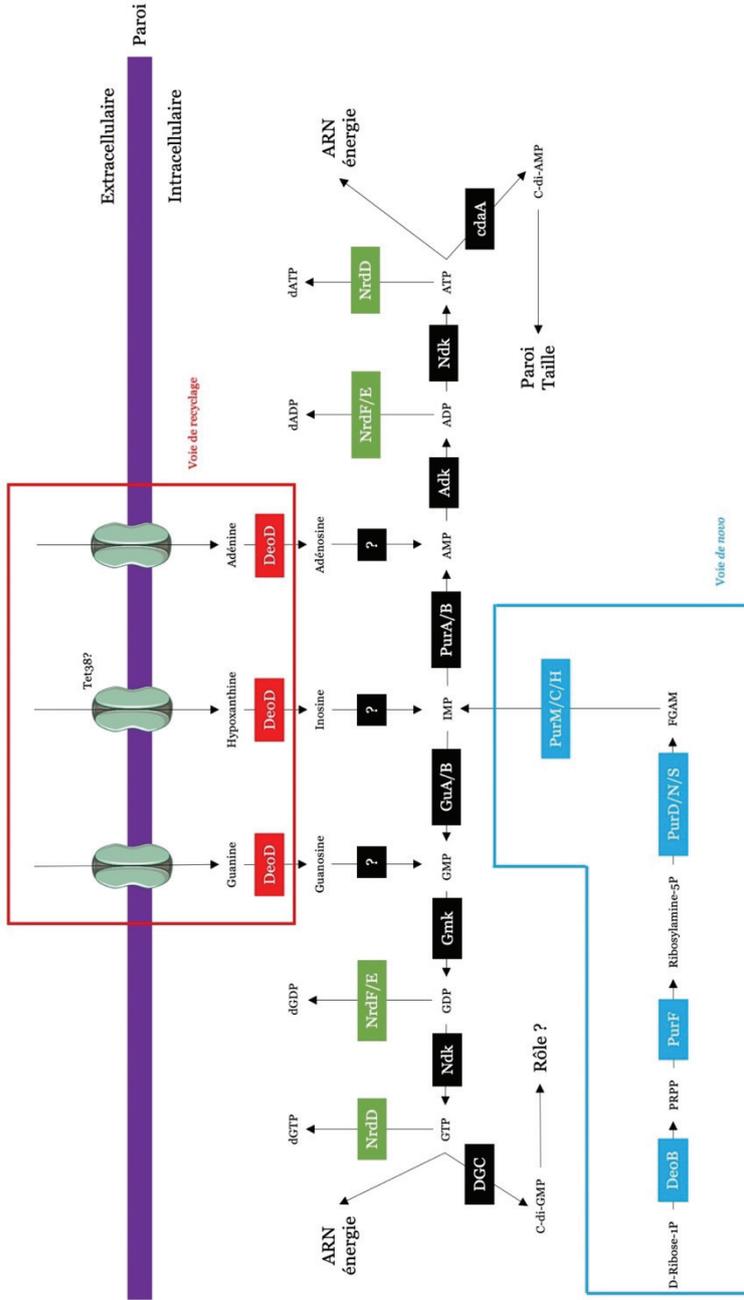


Figure IV-4 : Rôle du métabolisme des purines chez *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa*. La voie de novo (bleue) permet la synthèse à partir de D-ribose-1P d'inosine monophosphate (IMP) à l'aide des gènes *deoB* et de l'opéron *pur*. La voie de recyclage permet la production d'IMP à partir de précurseurs nucléobases provenant du milieu extracellulaire ou du milieu intracellulaire grâce à *DeoD*. L'IMP est ensuite soit utilisé pour synthétiser du guanosine mono-di- ou triphosphate (GMP/GDP/GTP) (gène *guaA/B*, *gmk*, *ndk*) ou de l'adénosine mono-di- ou triphosphate (AMP/ADP/ATP) (gène *purA/B*, *adk*, *ndk*). GTP et ATP peuvent ensuite être transformés en c-di-GMP ou c-di-AMP, messagers secondaires régulant des fonctions physiologiques chez *S. aureus*. Les gènes essentiels à la coexistence déterminés par TN-seq sont encadrés en bleus tandis que les gènes identifiés lors de l'analyse du RNA-seq sont en rouges (surexpression) et en verts (sous-expression). Ces données indiqueraient une accumulation de ribonucléotides chez *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa*.

Discussion et perspectives

effectuées sur les gènes *pur* pour observer si une surexpression de cet opéron est réelle. Nous pourrions ensuite suivre l'expression des gènes impliqués dans la production de GMP/GDP et AMP/ADP à partir d'IMP (*guaA/B* et *adk*) (Brune et al., 1985; Makowska-Grzyska et al., 2012; Tiedeman et al., 1985). De plus, il est important de noter que les molécules GTP et ATP sont les précurseurs directs de c-di-AMP et c-di-GMP, messagers secondaires importants pour la régulation de nombreux gènes (Kalia et al., 2012a). Ils sont notamment impliqués dans la virulence de *Streptococcus pyogenes* (Cho and Kang, 2013) et dans la synthèse de la paroi de *S. aureus* ainsi que la régulation de sa taille (Fahmi et al., 2017). Afin d'évaluer si ces molécules sont aussi surproduites dans nos conditions, un suivi d'expression en coculture des gènes *cdmA/DacA* (c-di-AMP) et DGC (c-di-GMP) sera effectué. La concentration en c-di-AMP pourra être évaluée par ELISA en coculture (Peng et al., 2016) et comparée aux valeurs obtenues en monoculture de *S. aureus*. Enfin, la caractérisation du rôle de c-di-AMP/c-di-GMP chez *S. aureus* sera effectuée par la construction de mutants isogéniques impactés dans la voie de synthèse de ce composé.

De façon étonnante, le gène *deoD* (voie de recyclage des purines) se retrouve en structure opéronique avec *tet38* (Truong-Bolduc et al., 2005). La voie de recyclage des purines utilise les bases nucléiques déjà existantes dans la bactérie ou importées du milieu extracellulaire (G. Ducati et al., 2011). Le gène *tet38*, pompe à efflux aux antibiotiques et en opéron avec *deoD*, pourrait ainsi être impliqué dans l'import de purines et approvisionner la voie de recyclage. Les rôles de Tet38 dans la résistance à la tétracycline et dans l'internalisation aux cellules épithéliales pulmonaires ne seraient alors qu'un effet secondaire dû aux besoins en base purine lors de cocultures. Le rôle exact de *tet38* dans l'import des purines reste toutefois à être élucidé. Le dosage intracellulaire de purines est possible grâce à l'utilisation de chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) (Shi et al., 2014). Ce dosage dans une souche sauvage, mutante et sur-exprimant *tet38* permettra de vérifier son rôle dans le métabolisme des purines.

IV.3. Les polyamines, potentiel signal des dérégulations transcriptomiques

Lors de la coexistence avec *P. aeruginosa*, *S. aureus* modifie son transcriptome entraînant une surexpression des pompes à efflux aux antibiotiques *nor* dont *norA*, *norC* et *tet38*. L'investigation du signal menant à ces dérégulations suggère que, de façon surprenante, la ou les molécules inductrices et produites par *P. aeruginosa* ne se retrouvent pas ou en quantité insuffisante dans son surnageant de culture, et qu'un contact proche et/ou direct entre les bactéries est nécessaire. En effet, les études menées jusqu'à maintenant ont montré que le surnageant de *P. aeruginosa* était responsable des effets observés lors des interactions compétitives avec *S. aureus* (Filkins et al., 2015; Fugère et al., 2014; Limoli et al., 2017; Machan et al., 1992). En coexistence, il semblerait donc qu'une interaction proche se produise et permette de modifier la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*. Dans le but de démontrer qu'un contact direct est réellement nécessaire, le promoteur de *tet38* devra être cloné en amont d'un gène rapporteur (e.g *gfp*) et un suivi de la fluorescence en time-lapse par microscopie lors de la coculture avec *P. aeruginosa* permettra de regarder précisément si un contact bactérie-bactérie est nécessaire à la surexpression de *tet38*.

L'analyse transcriptomique a révélé que l'opéron *potRABCD* impliqué dans l'import des polyamines est surexprimé en présence de *P. aeruginosa*. Les polyamines sont des molécules linéaires polycationiques retrouvées dans la plupart des organismes. Les principaux représentants de cette famille sont la cadavérine, la putrescine, la spermidine et la spermine. Elles présentent un rôle pléiotropique sur les processus cellulaires (Shah and Swiatlo, 2008), tel que :

- Augmentation de la synthèse des protéines en se fixant et stabilisant les ribosomes aux ARNm
- Diminution du stress oxydatif par liaison aux ROS
- Augmentation de la formation de biofilm en activant les gènes impliqués dans sa formation
- Induction l'expression de facteurs de virulence comme le T3SS chez *P. aeruginosa* (Zhou et al., 2007)

La spermine est exclusivement produite par les cellules eucaryotes et est utilisée comme agent antimicrobien. En effet, la concentration en spermine augmente au

Discussion et perspectives

niveau des sites infectieux et devient toxique, notamment pour les firmicutes ne possédant pas les gènes nécessaires à la dégradation de cette polyamine. Chez *S. aureus*, l'apport dans les souches USA300 de l'élément ACME (Arginine Catabolism Mobile Element) permet l'acquisition du gène *speG* dégradant la spermine (Joshi et al., 2011).

Les autres types de polyamines peuvent être produits par les bactéries, selon deux voies de synthèse différentes. La première, la synthèse *de novo*, commence par la décarboxylation de précurseur d'acides aminés en polyamines par l'intermédiaire des gènes *spe* localisés sur deux structures opéroniques différentes. La seconde est l'import de polyamines issus du milieu extracellulaire via le système Pot. Chez *S. aureus*, qui ne possède pas de système *spe* et par conséquent pas de synthèse *de novo* de polyamines, le système PotRABCD est présent et permet la capture de spermine et de spermidine (Shah and Swiatlo, 2008). Le fonctionnement exact de ce transporteur a été caractérisé chez *E. coli* et nous pouvons supposer un rôle similaire chez *S. aureus* (Kashiwagi et al., 1993; Pistocchi et al., 1993). Il s'agit d'un transporteur de type ABC où les protéines périssplamiques PotD sont responsables de la liaison avec le substrat, les dimères de protéines PotA sont des ATPases associées à la membrane. PotC et PotB forment quant à elles le canal transmembranaire. La liaison avec la spermine ou la spermidine conduit à un changement tridimensionnel de la structure de PotB/PotC conduisant à l'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi par les protéines dimériques PotA. L'apport d'énergie fourni par cette lyse permet de faire passer contre le gradient électrochimique les polyamines dans la bactérie. La régulation de l'expression de *potABCD* se fait au moyen de la protéine régulatrice PotR dont la fonction inhibitrice ou activatrice de l'opéron n'a jamais été montrée chez *S. aureus* (Yao and Lu, 2014a, 2014b).

Les données du RNA-seq montrent qu'une surexpression de l'opéron *potRABCD* se produit en coculture avec *P. aeruginosa*. Les surexpressions de *potR* et de *potABCD* suggèrent que ce régulateur est un activateur transcriptionnel de l'opéron. L'induction de ces gènes se fait, dans l'état des connaissances actuelles, uniquement en présence de polyamines (Yao and Lu, 2014a, 2014b), il est donc très probable que cette augmentation de l'expression soit due à la présence de polyamines dans le milieu en coculture. Chez *P. aeruginosa*, aucun système d'export de polyamines n'a été caractérisé. Les polyamines sont soit localisées dans le cytoplasme et catabolisées par les gènes *spe*, soit exportées à la membrane externe dans le cas de la spermidine

Discussion et perspectives

(Johnson et al., 2012). Cette polyamine se lie au LPS électrostatiquement, le stabilise et le protège contre l'action d'antibiotiques polycationiques tels que la polymixine B ou encore contre des stress oxydatifs médiés par les ROS (Johnson et al., 2012). Nous proposons donc un modèle où *S. aureus* est capable de détecter la spermidine à la membrane externe de *P. aeruginosa* via PotRABCD, de le transporter, avec pour conséquence une modification de sa signature transcriptionnelle et/ou traductionnelle.

L'étude menée par Yao et al., en 2014 a permis d'étudier l'impact de la spermine sur le transcriptome de *S. aureus*. De façon intéressante, des gènes communs avec nos résultats de RNA-seq sont impactés de façon similaire. Nous retrouvons ainsi une surexpression des gènes impliqués dans l'import du fer (*sirAB*), une sous-expression des gènes faisant partie du régulon de SigB (*opuD*, *fda* et *hla*), une sous-expression des gènes *nrd* (synthèse *de novo* de deoxyribonucléotides) et une surexpression des gènes *tetM* et *norA* (Yao and Lu, 2014a). Cependant, l'étude a été menée à l'aide d'une puce à ARN, et il est possible que des transcrits n'aient pas été identifiés dû à un recouvrement insuffisant. Par exemple, le gène *norC* n'était pas présent sur la puce GeneChip *S. aureus* genome assay utilisée par Yao et Lu. De plus, aucune étude ne montre l'impact phénotypique de la spermidine sur *S. aureus*. Il serait alors judicieux d'étudier, tant bien au niveau transcriptomique (RNA-seq) que protéomique (MS/MS) l'impact de la spermidine à des concentrations physiologiques, retrouvées notamment au niveau des membranes de *P. aeruginosa* (10-50µM) (Johnson et al., 2012). De plus, un suivi de fluorescence (cinétique ou en time-laps) d'une coculture d'un mutant ne produisant plus de spermidine chez *P. aeruginosa* ($\Delta speD \Delta PA4773$) avec une souche de *S. aureus* *ptet38-gfp* permettrait de confirmer que la spermidine est bien le signal responsable de la surexpression de *tet38*. Cette expérience pourrait aussi être réalisée dans une souche *S. aureus* $\Delta potRABCD$ pour déterminer le rôle de ce transporteur dans la capture et la transduction du signal.

Une étude par métabolomique non ciblée réalisée sur des souches de *P. aeruginosa* d'infections précoces ou tardives a montré une évolution de l'expression des polyamines au cours de l'infection, en lien avec le phénotype de virulence de l'isolat. Une diminution de la synthèse des polyamines et notamment de la spermidine est observée chez les clones de colonisation ancienne et de virulence diminuée (Thèse Oriane Moyne). Par ailleurs, une augmentation du niveau de polyamines est observée dans le crachat des patients CF lors d'exacerbations, en comparaison à des patients CF

Discussion et perspectives

en état stable (Grasemann et al., 2012). Les patients en exacerbations traités par antibiothérapies présentent une diminution du niveau de polyamines, suggérant que la source de production dans les crachats est probablement d'origine bactérienne. *S. aureus* étant sensible aux fortes concentrations de polyamines (absence des gènes *spe* pour les souches MSSA), l'adaptation de *P. aeruginosa* à son hôte favoriserait ainsi le phénotype de coexistence avec *S. aureus* en lien avec la diminution de la production de polyamines. A des concentrations sub-inhibitrices, ces molécules conservent leur action sur le transcriptome de *S. aureus* (Yao and Lu, 2014a). Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* d'infections tardives, présentant une virulence moindre vis-à-vis de *S. aureus* et produisant de faible concentration de polyamines, pourraient être responsables des dérégulations transcriptomiques observées chez *S. aureus*. Des tests de compétition ainsi que des analyses transcriptomiques avec des isolats cliniques de *P. aeruginosa* présentant des niveaux de production de polyamines variables pourront être réalisés pour confirmer le rôle de ces molécules dans la coexistence avec *S. aureus*.

IV.4. L'impact de la co-infection et de la coexistence chez les patients atteints de mucoviscidose

L'étude clinique rétrospective menée dans la partie 2 des résultats a permis de mieux caractériser l'impact de la co-infection sur l'état de santé des patients et de prendre en compte, pour la première fois, l'état d'interaction entre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Nos résultats sur la cohorte lyonnaise révèlent que les personnes co-infectées par *S. aureus/P. aeruginosa* présentent un bilan clinique plus sévère que la mono-infection par *S. aureus*. Il a été montré par plusieurs études cliniques que la mono-infection par *S. aureus* était moins sévère qu'une mono-infection par *P. aeruginosa* ou une co-infection par ces deux bactéries (Ahlgren et al., 2015; Cios et al., 2019a; Gangell et al., 2011; Hubert et al., 2013; Hudson et al., 1993; Limoli et al., 2016; Sagel et al., 2009). Nos résultats sont donc cohérents avec toutes ces études et confirment que la mono-infection par *S. aureus* semble cliniquement moins sévère que les autres types d'infections.

Concernant la comparaison entre la mono-infection par *P. aeruginosa* et la co-infection *S. aureus/P. aeruginosa*, aucune différence sur le bilan clinique ne sépare les deux groupes mis à part l'âge (le groupe mono-infection présente un âge médian/moyen plus élevé que le groupe co-infection) et l'indice de masse corporelle (IMC), plus élevé chez les personnes mono-infectées que les co-infectées. Nos résultats sont en accord avec l'étude menée par (Ahlgren et al., 2015) mais en désaccord avec d'autres montrant que la mono-infection par *P. aeruginosa* ou la co-infection est la plus sévère (Cios et al., 2019a; Gangell et al., 2011; Hubert et al., 2013; Hudson et al., 1993; Limoli et al., 2016; Sagel et al., 2009). En regardant précisément la composition des cohortes de patients étudiées, il semblerait que chez les enfants ou de jeunes adolescents (<13ans), la mono-infection à *P. aeruginosa* soit plus sévère que la co-infection *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Gangell et al., 2011; Hudson et al., 1993). Ainsi, l'incidence de la co-infection serait dépendante de l'âge des patients. L'acquisition précoce de *P. aeruginosa* chez les enfants/adolescents expliquerait alors la sévérité d'une mono-infection pour les patients de cette tranche d'âge. Le peu d'enfants ou d'adolescents de moins de 13ans dans notre cohorte ne nous permet pas de confirmer cette observation, mais une seconde étude pourrait être envisagée.

Discussion et perspectives

L'âge plus avancé des personnes mono-infectées par *P. aeruginosa* suggère que *S. aureus* disparaît, ou devient indétectable chez les personnes CF âgées. La co-infection *S. aureus/P. aeruginosa* pourrait être alors l'étape intermédiaire d'une colonisation séquentielle par ces deux bactéries : colonisation par *S. aureus*, puis colonisation par *P. aeruginosa* (co-occurrence *S. aureus/P. aeruginosa*) et enfin mono-infection par *P. aeruginosa* (disparition de *S. aureus* ou non détectable). Par ailleurs, l'IMC pourrait être également être corrélé à l'âge et expliquerait pourquoi les patients mono-infectés par *P. aeruginosa*, plus âgés, présentent un IMC plus élevé.

La seconde partie de cette étude a permis de rechercher un éventuel lien entre l'état d'interaction compétition/coexistence entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* et l'état de santé des patients. Dans notre cohorte, 24.53% des patients sont co-colonisés par *S. aureus/P. aeruginosa*. Parmi eux, 65.38% des patients possèdent un couple *S. aureus/P. aeruginosa* en coexistence, déterminé par les tests de compétition sur agar. Cette information est précieuse car elle montre pour la première fois que l'état de coexistence est plus fréquent que l'état de compétition, qui est pourtant le mieux caractérisé. Aucune différence d'un point de vue clinique n'a cependant été identifiée entre le groupe compétition et le groupe coexistence, indiquant une sévérité identique quel que soit l'état d'interaction des bactéries infectantes. Les deux groupes sont composés de personnes ayant le même âge (23 ans en moyenne). Dans le modèle actuel, les souches d'infection dites précoces de *P. aeruginosa* non-adaptées à l'environnement pulmonaire sont compétitrices envers *S. aureus*. Après une phase d'adaptation qui conduit notamment à une altération des systèmes de quorum-sensing, les souches patho-adaptatives dites d'infections tardives coexistent alors avec *S. aureus*. Toutefois, nos données ne mettent en évidence aucun lien entre la durée d'infection est le type d'interaction, et ne corroborent donc pas ce modèle. Une hypothèse pourrait être que l'état d'interaction est réversible et ne dépend pas du temps de colonisation, mais plutôt de l'environnement pulmonaire (inflammation, disponibilité en nutriments, concentration des autres partenaires microbiens). Cette réversibilité pourrait être un moyen pour *P. aeruginosa* de contrôler et diminuer la population de *S. aureus* lorsque celle-ci atteint un certain seuil, grâce à l'état compétitif. L'état de coexistence quant à lui permettrait à *P. aeruginosa* d'être moins agressif vis-à-vis de l'hôte une fois des conditions plus favorables, et de mieux se dissimuler et persister dans les poumons (diminution production facteurs de virulence et augmentation de la formation du biofilm).

Discussion et perspectives

En comparaison avec les patients colonisés uniquement par *S. aureus*, les personnes CF colonisées par un couple compétiteur présentaient un FEV1% plus basse, différence que nous n'avons pas mis en évidence dans le groupe de patients infectés par un couple de coexistence. Ce résultat peut révéler un état pulmonaire un peu plus détérioré dans le groupe compétition que dans le groupe coexistence. Les souches en compétition sont généralement productrices de facteurs de virulence (rhamnolipides, protéases, phénazines) ayant un impact négatif sur les fonctions pulmonaires. En coexistence, nos données de l'étude *in vitro* (première partie de la discussion) révèlent que *P. aeruginosa* induirait une sous-expression du quorum-sensing de *S. aureus*, engendrant une diminution de la production des facteurs de virulence du staphylocoque. De plus les souches de *P. aeruginosa* coexistantes présentent une virulence amoindrie (Michelsen et al., 2014, 2016) Cette FEV1% plus basse pourrait donc être attribuable à une virulence plus importantes de nos deux bactéries lors de l'état compétiteur. En augmentant la population de personnes CF co-infectées, nous pourrions peut-être être en mesure de confirmer que les couples en compétition détériorent davantage la fonction pulmonaire.

IV.5. Conclusion

Pseudomonas aeruginosa et *Staphylococcus aureus* sont deux bactéries capables de coloniser des niches infectieuses diverses et variées. Leurs capacités d'adaptation rapide à des environnements variés et à des stress divers témoignent d'une production, régulée dans l'espace et dans le temps, de facteurs nécessaires à la colonisation. La coexistence entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* chez les patients CF montre que deux bactéries peuvent interagir entre elles, adapter l'expression de leur génome conduisant à des modifications phénotypiques. Un potentiel dialogue s'opérerait faisant intervenir les grands systèmes de régulations de *S. aureus*. La conséquence majeure pour l'hôte pourrait être plus néfaste car la persistance et l'antibiorésistance d'au moins un des deux partenaires augmentent. Néanmoins, les signaux responsables de ces dérégulations restent à être élucidés. Ces découvertes enrichiraient les connaissances sur les communications inter-espèces. De plus, l'étude cette fois-ci de l'impact de la coexistence chez *P. aeruginosa* permettra d'avoir une vision globale de cette interaction bactérienne. Faire le lien entre les données transcriptomiques disponibles chez nos deux bactéries permettra d'avoir un modèle complet et dynamique de l'interaction à un temps donné. Les connaissances acquises dans ce modèle de coexistence doivent être utilisées pour étudier les interactions bactériennes mais surtout, devrait être considérées lors du traitement des infections poly-bactériennes. Ainsi empêcher la communication bactérienne pourrait permettre d'améliorer l'action des différents traitements.

V. Communications orales

- Poster présenté à la société Française de Microbiologie, Cité des Sciences et de l'Industrie, Paris, 2019 et au workshop microbiome, CNRS, Lyon, 2019.

Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
 Paul Briand¹, Laura Camus¹, Sylvère Bastien¹, Anne Doléans-Jordheim¹, François Vandenesch^{1,2} and Karen Moreau¹

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Université Lyon1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR5308, Lyon, France.
²Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.
³Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Abstract

Cfr gene dysfunction in cystic fibrosis (CF) patients causes the outcome of a thick dehydrated mucus responsible for chronic lung infections. The two most frequently found bacteria in this mucus are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The early-infecting strains of *P. aeruginosa* outcompete *S. aureus* like the late-infecting strains, which coexist with *S. aureus*. So far, the coexistent state is poorly understood and no studies were conducted to decipher its impact upon *S. aureus* lifestyle. By using a transcriptomic approach (RNA-seq and RT-qPCR), we identified 140 *S. aureus* genes dysregulated in presence of *P. aeruginosa* coexisting strains. Among them, genes belonging to antibiotics efflux pumps (*norA*, *norC* and *tet38*) were specifically overexpressed by a direct contact with *P. aeruginosa*. These dysregulations led to a better survival upon antibiotics exposure and increased the internalization rate within pulmonary epithelial cell line. This study revealed that by coexisting, *S. aureus* modified its antibiotic resistance and its behavior toward eukaryotic cells.

Transcriptomic impacts

Coexisting strains of *P. aeruginosa* dysregulate *S. aureus* genes expression. RNA-seq analysis was performed on 2 pairs of *S. aureus/P. aeruginosa* after 4 hours of co-culture. Genes expression was compared between mono- and co-culture. 140 genes were dysregulated.

Confirmation of RNA-seq data by RT-qPCR. Twelve pairs of *S. aureus/P. aeruginosa* were co-cultivated and RNAs were extracted after 4, 6 and 8 hours. *tet38*, *norA* and *norC* were overexpressed in at least 50% of the pairs tested in comparison with mono-culture. These genes encode for efflux pumps involved in antibiotics resistance to tetracycline and quinolones and internalization within epithelial cells line in *S. aureus*.

Increase of antibiotics resistance and internalization

Tetracycline and ciprofloxacin resistance increased in *S. aureus* when co-cultivated with coexisting strains of *P. aeruginosa*. Twelve pairs of *S. aureus/P. aeruginosa* were co-cultivated and exposed to antibiotics for 2h at MIC or 2MIC. Each dot represents a pair of strain. Results are represented as bacterial survival (number of *S. aureus* in co-culture/number of *S. aureus* in mono-culture). ** P<0.01, *** P<0.001, Friedman test.

Internalization of *S. aureus* within pulmonary epithelial cells line (A549) increased when co-cultivated with coexisting strains of *P. aeruginosa*. Four pairs of *S. aureus/P. aeruginosa* were co-cultivated and *S. aureus* internalization was monitored by a gentamycin protection assay. ** P<0.01, unpaired t-test.

Signal from *P. aeruginosa* involved

S. aureus genes dysregulation required a close contact with *P. aeruginosa*. A culture of *P. aeruginosa* was deposited onto the top-well containing a 0.4µm filter. *S. aureus* culture was deposited onto the bottom well. No *P. aeruginosa* passage was detected in the bottom well throughout the assay (8h). *P<0.05, **P<0.01, unpaired t-test.

Only *P. aeruginosa* could trigger the *norA*, *norC* and *tet38* overexpression. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cenocepacia* clinical strains were co-cultivated with *S. aureus* and *norA*, *norC* and *tet38* expressions were monitored. *P_{adj}<0.05, **P_{adj}<0.01 One-way Anova

Conclusion/Perspectives

By coexisting with *P. aeruginosa*, *S. aureus* massively modifies its genes expression. These dysregulations lead to increase the antibiotics resistance and the internalization within pulmonary cell line. Bacteria interactions should be considered in the treatment of polymicrobial infections.

- Prix de la meilleure présentation orale, Colloque des Jeunes chercheurs en mucoviscidose, Vaincre la Mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, 26 Février 2019.

VI. Références

Références

- Ahlgren, H.G., Benedetti, A., Landry, J.S., Bernier, J., Matouk, E., Radzioch, D., Lands, L.C., Rousseau, S., and Nguyen, D. (2015). Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm. Med.* *15*, 67.
- Akaike, H. (1998). Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In *Selected Papers of Hirotugu Akaike*, E. Parzen, K. Tanabe, and G. Kitagawa, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 199–213.
- Allison, A.C. (2009). Genetic control of resistance to human malaria. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 499–505.
- Alvarez-Ortega, C., and Harwood, C.S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol. Microbiol.* *65*, 153–165.
- Alves, P.M., Al-Badi, E., Withycombe, C., Jones, P.M., Purdy, K.J., and Maddocks, S.E. (2018). Interaction between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathog. Dis.* *76*.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *31*, 166–169.
- Andersen, D.H. (1938). CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. *Am. J. Dis. Child.* *56*, 344.
- Armbruster, C.E., Hong, W., Pang, B., Weimer, K.E.D., Juneau, R.A., Turner, J., and Swords, W.E. (2010). Indirect Pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Polymicrobial Otitis Media Occurs via Interspecies Quorum Signaling. *MBio* *1*, e00102-10-e00102-19.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004). New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 6887–6891.

Références

- Bachhuber, T., König, J., Voelcker, T., Mürle, B., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2005). Cl⁻ interference with the epithelial Na⁺ channel ENaC. *J. Biol. Chem.* *280*, 31587–31594.
- Baldan, R., Cigana, C., Testa, F., Bianconi, I., De Simone, M., Pellin, D., Di Serio, C., Bragonzi, A., and Cirillo, D.M. (2014). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of *Staphylococcus aureus* In Vitro and Murine Models of Co-Infection. *PLoS ONE* *9*, e89614.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* *19*, 455–477.
- Barnabie, P.M., and Whiteley, M. (2015). Iron-Mediated Control of *Pseudomonas aeruginosa*-*Staphylococcus aureus* Interactions in the Cystic Fibrosis Lung. *J. Bacteriol.* *197*, 2250–2251.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 6506–6511.
- Beasley, F.C., Vinés, E.D., Grigg, J.C., Zheng, Q., Liu, S., Lajoie, G.A., Murphy, M.E.P., and Heinrichs, D.E. (2009). Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *72*, 947–963.
- Berdiev, B.K., Cormet-Boyaka, E., Tousson, A., Qadri, Y.J., Oosterveld-Hut, H.M.J., Hong, J.S., Gonzales, P.A., Fuller, C.M., Sorscher, E.J., Lukacs, G.L., et al. (2007). Molecular proximity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel assessed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* *282*, 36481–36488.
- Besier, S., Smaczny, C., von Mallinckrodt, C., Krahl, A., Ackermann, H., Brade, V., and Wichelhaus, T.A. (2007a). Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 168–172.

Références

- Besier, S., Ludwig, A., Ohlsen, K., Brade, V., and Wichelhaus, T.A. (2007b). Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 297, 217–225.
- Bhatt, J.M. (2013). Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 22, 205–216.
- Bischoff, M., Entenza, J.M., and Giachino, P. (2001). Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 5171–5179.
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Suppl.* 1–51.
- Blencke, H.-M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M., and Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.* 5, 133–149.
- Bobadilla, J.L., Macek, M., Fine, J.P., and Farrell, P.M. (2002). Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* 19, 575–606.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A.C., Benito, Y., Jacquier, A., et al. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* 21, 1353–1366.
- Bokarewa, M.I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 504–509.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 2114–2120.
- Bombieri, C., Seia, M., and Castellani, C. (2015). Genotypes and Phenotypes in Cystic Fibrosis and Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator–Related Disorders. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 36, 180–193.

Références

- Borzan, V., Tomašević, B., and Kurbel, S. (2014). Hypothesis: Possible respiratory advantages for heterozygote carriers of cystic fibrosis linked mutations during dusty climate of last glaciation. *J. Theor. Biol.* *363*, 164–168.
- Bosch, L., Bosch, B., De Boeck, K., Nawrot, T., Meyts, I., Vanneste, D., Le Bourlegat, C.A., Croda, J., and da Silva Filho, L.V.R.F. (2017). Cystic fibrosis carriership and tuberculosis: hints toward an evolutionary selective advantage based on data from the Brazilian territory. *BMC Infect. Dis.* *17*, 340.
- Bouchiat, C., Moreau, K., Devillard, S., Rasigade, J.-P., Mosnier, A., Geissmann, T., Bes, M., Tristan, A., Lina, G., Laurent, F., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* infective endocarditis versus bacteremia strains: Subtle genetic differences at stake. *Infect. Genet. Evol.* *36*, 524–530.
- Boutin, S., Graeber, S.Y., Weitnauer, M., Panitz, J., Stahl, M., Clausnitzer, D., Kaderali, L., Einarsson, G., Tunney, M.M., Elborn, J.S., et al. (2015). Comparison of Microbiomes from Different Niches of Upper and Lower Airways in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* *10*.
- Bouvier, N.M. (2016). Cystic fibrosis and the war for iron at the host–pathogen battlefield. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 1480–1482.
- Brennan, A.L., and Beynon, J. (2015). Clinical updates in cystic fibrosis-related diabetes. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *36*, 236–250.
- Briaud, P., Camus, L., Bastien, S., Doléans-Jordheim, A., Vandenesch, F., and Moreau, K. (2019). Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells. *Sci. Rep.* *9*, 1–14.
- Brito, N., Falcón, M.A., Carnicero, A., Gutiérrez-Navarro, A.M., and Mansito, T.B. (1989). Purification and peptidase activity of a bacteriolytic extracellular enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* *140*, 125–137.
- Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., and Taylor, C.E. (2005). Human polymicrobial infections. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 253–255.

Références

- Brooke, J.S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* *25*, 2–41.
- Bruce Marshall, Albert Faro, Aliza Fink, Deena Loeffler, Alexander Elbert, Thomas O’Neil, Tucker Rush, and Samar Rizvi (2018). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2017 Annual Data Report.
- Brune, M., Schumann, R., and Wittinghofer, F. (1985). Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (*adk*) of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *13*, 7139–7151.
- Burgel, P.-R., Bellis, G., Olesen, H.V., Viviani, L., Zolin, A., Blasi, F., and Elborn, J.S. (2015). Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur. Respir. J.* *46*, 133–141.
- Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C., Hoffmann, W.H., Peschel, A., Wolz, C., and Goerke, C. (2010). Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J. Infect. Dis.* *201*, 1414–1421.
- Caldwell, C.C., Chen, Y., Goetzmann, H.S., Hao, Y., Borchers, M.T., Hassett, D.J., Young, L.R., Mavrodi, D., Thomashow, L., and Lau, G.W. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am. J. Pathol.* *175*, 2473–2488.
- Callebaut, I., Chong, P.A., and Forman-Kay, J.D. (2018). CFTR structure. *J. Cyst. Fibros.* *17*, S5–S8.
- Carmody, L.A., Zhao, J., Schloss, P.D., Petrosino, J.F., Murray, S., Young, V.B., Li, J.Z., and LiPuma, J.J. (2013). Changes in Cystic Fibrosis Airway Microbiota at Pulmonary Exacerbation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *10*, 179–187.
- Carmody, L.A., Zhao, J., Kalikin, L.M., LeBar, W., Simon, R.H., Venkataraman, A., Schmidt, T.M., Abdo, Z., Schloss, P.D., and LiPuma, J.J. (2015). The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. *Microbiome* *3*, 12.

Références

- Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., and Andrews, S.C. (2006). Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* *19*, 143–157.
- Casals, T., Nunes, V., Palacio, A., Giménez, J., Gaona, A., Ibáñez, N., Morral, N., and Estivill, X. (1993). Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum. Genet.* *91*, 66–70.
- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Cassiman, J.J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B.M., Bombieri, C., Brown, A., et al. (2008). Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* *7*, 179–196.
- Caverly, L.J., and LiPuma, J.J. (2018). Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. *Expert Rev. Respir. Med.* *12*, 857–865.
- Chang, X., Mengos, A., Hou, Y., Cui, L., Jensen, T.J., Aleksandrov, A., Riordan, J.R., and Gentsch, M. (2008). Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J. Cell Sci.* *121*, 2814.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 6076–6085.
- Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R.A., Peters, G., Herrmann, M., and Kahl, B.C. (2008). In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by thyA) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *190*, 834–842.
- Chen, E.Y.T., Yang, N., Quinton, P.M., and Chin, W.-C. (2010). A new role for bicarbonate in mucus formation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *299*, L542-549.
- Chen, P.R., Nishida, S., Poor, C.B., Cheng, A., Bae, T., Kuechenmeister, L., Dunman, P.M., Missiakas, D., and He, C. (2009). A new oxidative sensing and regulation

Références

pathway mediated by the MgrA homologue SarZ in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **71**, 198–211.

Cho, K.H., and Kang, S.O. (2013). Streptococcus pyogenes c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence. *PLoS One* **8**, e69425.

Chotirmall, S.H., Smith, S.G., Gunaratnam, C., Cosgrove, S., Dimitrov, B.D., O'Neill, S.J., Harvey, B.J., Greene, C.M., and McElvaney, N.G. (2012). Effect of estrogen on pseudomonas mucoidy and exacerbations in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1978–1986.

Cigana, C., Bianconi, I., Baldan, R., De Simone, M., Riva, C., Sipione, B., Rossi, G., Cirillo, D.M., and Bragonzi, A. (2017). Staphylococcus aureus impacts Pseudomonas aeruginosa chronic respiratory disease in murine models. *J. Infect. Dis.*

Cios, K., Cohen, B., Quittell, L.M., Liu, J., and Larson, E.L. (2019a). Impact of colonizing organism in the respiratory tract on the incidence, duration, and time between subsequent hospitalizations among patients with cystic fibrosis. *Am. J. Infect. Control* **47**, 750–754.

Cios, K., Cohen, B., Quittell, L.M., Liu, J., and Larson, E.L. (2019b). Impact of colonizing organism in the respiratory tract on the incidence, duration, and time between subsequent hospitalizations among patients with cystic fibrosis. *Am. J. Infect. Control* **47**, 750–754.

Conese, M., Copreni, E., Di Gioia, S., De Rinaldis, P., and Fumarulo, R. (2003). Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **2**, 129–135.

Crosby, H.A., Schlievert, P.M., Merriman, J.A., King, J.M., Salgado-Pabón, W., and Horswill, A.R. (2016). The Staphylococcus aureus Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. *PLoS Pathog.* **12**.

Cuthbert, A.W., Halstead, J., Ratcliff, R., Colledge, W.H., and Evans, M.J. (1995). The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: a murine study. *J. Physiol.* **482 (Pt 2)**, 449–454.

Références

- D'Argenio, D.A., Wu, M., Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Déziel, E., Smith, E.E., Nguyen, H., Ernst, R.K., Freeman, T.J.L., Spencer, D.H., et al. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* *64*, 512.
- Dasenbrook, E. (2011). Update on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* *17*, 437–441.
- Davies, D.G., and Marques, C.N.H. (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* *191*, 1393–1403.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 417–433.
- Davis, P.B. (2006). Cystic Fibrosis Since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 475–482.
- Debray, D., Narkewicz, M., Bodewes, F., Colombo, C., Housset, C., Jonge, H. de, Jonker, J., Kelly, D., Ling, S., Poynard, T., et al. (2017). Cystic Fibrosis–related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *65*, 443–448.
- DeJesus, M.A., Ambadipudi, C., Baker, R., Sassetti, C., and Ioerger, T.R. (2015). TRANSIT - A Software Tool for Himar1 TnSeq Analysis. *PLOS Comput. Biol.* *11*, e1004401.
- DeLeo, F.R., Diep, B.A., and Otto, M. (2009). Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *23*, 17–34.
- DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A.R., and Rumbaugh, K.P. (2014). Synergistic Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Wound Model. *Infect. Immun.* *82*, 4718–4728.
- Dentini, P., Marson, F.A.L., Bonadia, L.C., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, A.F., Levy, C.E., and Ribeiro, J.D. (2017). *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *206*, 447–461.

Références

- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., and Huffnagle, G.B. (2013). The Role of the Bacterial Microbiome in Lung Disease. *Expert Rev. Respir. Med.* 7, 245–257.
- Ding, Y., Fu, Y., Lee, J.C., and Hooper, D.C. (2012). Staphylococcus aureus NorD, a Putative Efflux Pump Coregulated with the Opp1 Oligopeptide Permease, Contributes Selectively to Fitness In Vivo. *J. Bacteriol.* 194, 6586–6593.
- Dodge, J.A. (2015). A millennial view of cystic fibrosis. *Dev. Period Med.* 19, 9–13.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11971–11975.
- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., and Surette, M.G. (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication: Modulation of *P. aeruginosa* by oropharyngeal flora. *Mol. Microbiol.* 50, 1477–1491.
- Duthie, E.S., and Lorenz, L.L. (1952). Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* 6, 95–107.
- Egan, M.E. (2016). Genetics of Cystic Fibrosis: Clinical Implications. *Clin. Chest Med.* 37, 9–16.
- Engelhardt, J.F., Zepeda, M., Cohn, J.A., Yankaskas, J.R., and Wilson, J.M. (1994). Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J. Clin. Invest.* 93, 737–749.
- Estrada-Veras, J., and Groninger, H. (2013). Palliative Care for Patients with Cystic Fibrosis #265. *J. Palliat. Med.* 16, 446–447.
- Fahmi, T., Port, G.C., and Cho, K.H. (2017). c-di-AMP: An Essential Molecule in the Signaling Pathways that Regulate the Viability and Virulence of Gram-Positive Bacteria. *Genes* 8.
- Farber, S., Shwachman, H., and Maddock, C.L. (1943). PANCREATIC FUNCTION AND DISEASE IN EARLY LIFE. I. PANCREATIC ENZYME ACTIVITY AND THE CELIAC SYNDROME 1. *J. Clin. Invest.* 22, 827–838.

Références

- Farrell, P.M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J. Cyst. Fibros.* *7*, 450–453.
- Filkins, L.M., Graber, J.A., Olson, D.G., Dolben, E.L., Lynd, L.R., Bhujju, S., and O’Toole, G.A. (2015). Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J. Bacteriol.* *197*, 2252–2264.
- FitzSimmons, S.C. (1993). The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J. Pediatr.* *122*, 1–9.
- Fogarty, A.W., Britton, J., Clayton, A., and Smyth, A.R. (2012). Are Measures of Body Habitus Associated With Mortality in Cystic Fibrosis? *Chest* *142*, 712–717.
- Foster, T.J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 430–449.
- Fournier, B., and Hooper, D.C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *182*, 3955–3964.
- Fournier, B., Aras, R., and Hooper, D.C. (2000). Expression of the Multidrug Resistance Transporter NorA from *Staphylococcus aureus* Is Modified by a Two-Component Regulatory System. *J. Bacteriol.* *182*, 664–671.
- Fournier, B., Klier, A., and Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *41*, 247–261.
- Fugère, A., Lalonde Séguin, D., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A.M., Frost, E., and Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS One* *9*, e86705.
- Fung, C., Naughton, S., Turnbull, L., Tingpej, P., Rose, B., Arthur, J., Hu, H., Harmer, C., Harbour, C., Hassett, D.J., et al. (2010). Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum. *J. Med. Microbiol.* *59*, 1089–1100.

Références

- G. Ducati, R., Breda, A., A. Basso, L., and S. Santos, D. (2011). Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Med. Chem.* *18*, 1258–1275.
- Gabriel, S.E., Brigman, K.N., Koller, B.H., Boucher, R.C., and Stutts, M.J. (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* *266*, 107–109.
- Gangell, C., Gard, S., Douglas, T., Park, J., de Klerk, N., Keil, T., Brennan, S., Ranganathan, S., Robins-Browne, R., Sly, P.D., et al. (2011). Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *53*, 425–432.
- Garcia, Y.M., Barwinska-Sendra, A., Tarrant, E., Skaar, E.P., Waldron, K.J., and Kehl-Fie, T.E. (2017). A Superoxide Dismutase Capable of Functioning with Iron or Manganese Promotes the Resistance of *Staphylococcus aureus* to Calprotectin and Nutritional Immunity. *PLoS Pathog.* *13*, e1006125.
- Giachino, P., Engelmann, S., and Bischoff, M. (2001). Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *183*, 1843–1852.
- Gibson, L.E., and Cooke, R.E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* *23*, 545–549.
- Gil Bellis, Clémence Dehillotte, and Lydie Lemonnier (2019). Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2017 Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques (Ined).
- Gillen, A.E., and Harris, A. (2012). Transcriptional regulation of CFTR gene expression. *Front. Biosci. Elite Ed.* *4*, 587–592.
- Grasemann, H., Shehnaz, D., Enomoto, M., Leadley, M., Belik, J., and Ratjen, F. (2012). L-Ornithine Derived Polyamines in Cystic Fibrosis Airways. *PLoS ONE* *7*, e46618.
- Grigg, J.C., Vermeiren, C.L., Heinrichs, D.E., and Murphy, M.E.P. (2007). Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE. *J. Biol. Chem.* *282*, 28815–28822.

Références

- Guldimann, C., Boor, K.J., Wiedmann, M., and Guariglia-Oropeza, V. (2016). Resilience in the Face of Uncertainty: Sigma Factor B Fine-Tunes Gene Expression To Support Homeostasis in Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 4456–4469.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *29*, 1072–1075.
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M.A., McIntosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., et al. (2011). A Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and the Complement Pathway. *Cell Host Microbe* *10*, 497–506.
- Hajishengallis, G., Darveau, R.P., and Curtis, M.A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 717–725.
- Halsey, C.R., Lei, S., Wax, J.K., Lehman, M.K., Nuxoll, A.S., Steinke, L., Sadykov, M., Powers, R., and Fey, P.D. (2017). Amino Acid Catabolism in *Staphylococcus aureus* and the Function of Carbon Catabolite Repression. *MBio* *8*.
- Hamosh, A., FitzSimmons, S.C., Macek, M., Knowles, M.R., Rosenstein, B.J., and Cutting, G.R. (1998). Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J. Pediatr.* *132*, 255–259.
- Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P., and Pier, G.B. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* *42*, 170–177.
- Hao, Y., Kuang, Z., Walling, B.E., Bhatia, S., Sivaguru, M., Chen, Y., Gaskins, H.R., and Lau, G.W. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2. *Cell. Microbiol.* *14*, 401–415.
- Hauser, A.R. (2009). The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 654–665.

Références

- Hawdon, N.A., Aval, P.S., Barnes, R.J., Gravelle, S.K., Rosengren, J., Khan, S., Ciofu, O., Johansen, H.K., Høiby, N., and Ulanova, M. (2010). Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *59*, 207–220.
- Heltshe, S.L., Khan, U., Beckett, V., Baines, A., Emerson, J., Sanders, D.B., Gibson, R.L., Morgan, W., and Rosenfeld, M. (2018). Longitudinal development of initial, chronic and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* *17*, 341–347.
- Hoffman, L.R., Déziel, E., D’Argenio, D.A., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., and Miller, S.I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19890–19895.
- Hogan, D.A., Willger, S.D., Dolben, E.L., Hampton, T.H., Stanton, B.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Czum, J., and Ashare, A. (2016). Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLOS ONE* *11*, e0149998.
- Hoo, Z.H., Edenborough, F.P., Curley, R., Prtak, L., Dewar, J., Allenby, M.I., Nightingale, J.A., and Wildman, M.J. (2018). Understanding *Pseudomonas* status among adults with cystic fibrosis: a real-world comparison of the Leeds criteria against clinicians’ decision. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *37*, 735–743.
- Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2017). In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *7*.
- Hubert, D., Réglie-Poupet, H., Sermet-Gaudelus, I., Ferroni, A., Le Bourgeois, M., Burgel, P.-R., Serreau, R., Dusser, D., Poyart, C., and Coste, J. (2013). Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* *12*, 497–503.

Références

- Hudson, V.L., Wielinski, C.L., and Regelman, W.E. (1993). Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J. Pediatr.* *122*, 854–860.
- Hunter, R.C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B.L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., and Newman, D.K. (2013). Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *MBio* *4*.
- Huse, H.K., Kwon, T., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Marcotte, E.M., and Whiteley, M. (2010). Parallel Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* over 39,000 Generations In Vivo. *MBio* *1*.
- Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., and Al-Awqati, Q. (1995). Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 3019–3023.
- Jacquot, J., Delion, M., Gangloff, S., Braux, J., and Velard, F. (2016). Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporos. Int.* *27*, 1401–1412.
- Jang, S. (2016). Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J. Microbiol. Seoul Korea* *54*, 1–8.
- Jankovic, I., and Brückner, R. (2007). Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *12*, 114–120.
- Janzon, L., Löfdahl, S., and Arvidson, S. (1989). Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet. MGG* *219*, 480–485.
- Jenkins, A., Diep, B.A., Mai, T.T., Vo, N.H., Warrenner, P., Suzich, J., Stover, C.K., and Sellman, B.R. (2015). Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *MBio* *6*, e02272-02214.
- Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., et al. (2007). Rapid necrotic killing

Références

of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 1329–1338.

Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12055–12059.

Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* *276*, 2027–2030.

Ji, H.L., Chalfant, M.L., Jovov, B., Lockhart, J.P., Parker, S.B., Fuller, C.M., Stanton, B.A., and Benos, D.J. (2000). The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* *275*, 27947–27956.

Johnson, L., Mulcahy, H., Kanevets, U., Shi, Y., and Lewenza, S. (2012). Surface-Localized Spermidine Protects the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane from Antibiotic Treatment and Oxidative Stress. *J. Bacteriol.* *194*, 813–826.

Joshi, G.S., Spontak, J.S., Klapper, D.G., and Richardson, A.R. (2011). Arginine catabolic mobile element encoded *speG* abrogates the unique hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to exogenous polyamines: ACME *speG* confers spermine resistance in *S. aureus*. *Mol. Microbiol.* *82*, 9–20.

Junge, S., Görlich, D., den Reijer, M., Wiedemann, B., Tümmler, B., Ellemunter, H., Dübbers, A., Küster, P., Ballmann, M., Koerner-Rettberg, C., et al. (2016). Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* *11*, e0166220.

Kalia, D., Meroy, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B.T., and Sintim, H.O. (2012a). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* *42*, 305–341.

Références

- Kalia, N.P., Mahajan, P., Mehra, R., Nargotra, A., Sharma, J.P., Koul, S., and Khan, I.A. (2012b). Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 2401–2408.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Kobayashi, H., and Igarashi, K. (1993). Functions of *potA* and *potD* proteins in spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *268*, 19358–19363.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* *10*, 845–858.
- Kelly, N.M., Kluffinger, J.L., Pasloske, B.L., Paranchych, W., and Hancock, R.E. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. *Infect. Immun.* *57*, 3841–3845.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* *245*, 1073–1080.
- Kerem, E., Viviani, L., Zolin, A., MacNeill, S., Hatziagorou, E., Ellemunter, H., Drevinek, P., Gulmans, V., Krivec, U., and Olesen, H. (2014). Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS Patient Registry. *Eur. Respir. J.* *43*, 125–133.
- Kesavalu, L., Holt, S.C., and Ebersole, J.L. (1998). Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in a murine model. *Oral Microbiol. Immunol.* *13*, 373–377.
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J.C., and Ohman, D.E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.* *268*, 7503–7508.
- Khan, I.A., Mirza, Z.M., Kumar, A., Verma, V., and Qazi, G.N. (2006). Piperine, a Phytochemical Potentiator of Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 810–812.

Références

- Kilby, J.M., Gilligan, P.H., Yankaskas, J.R., Highsmith, W.E., Edwards, L.J., and Knowles, M.R. (1992). Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 102, 70–75.
- Kilstrup, M., and Martinussen, J. (1998). A Transcriptional Activator, Homologous to the *Bacillus subtilis* PurR Repressor, Is Required for Expression of Purine Biosynthetic Genes in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180, 3907–3916.
- Kirchner, S., Fothergill, J.L., Wright, E.A., James, C.E., Mowat, E., and Winstanley, C. (2012). Use of Artificial Sputum Medium to Test Antibiotic Efficacy Against *Pseudomonas aeruginosa* in Conditions More Relevant to the Cystic Fibrosis Lung. *J. Vis. Exp.*
- Koch, R. (2018). Die Ätiologie der Tuberkulose (1882). In Robert Koch : Zentrale Texte, C. Gradmann, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 113–131.
- Korem, M., Gov, Y., and Rosenberg, M. (2010). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb. Pathog.* 48, 74–84.
- Korgaonkar, A., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., and Whiteley, M. (2013). Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1059–1064.
- Kulaksiz, H., Schmid, A., Hönscheid, M., Eissele, R., Klempnauer, J., and Cetin, Y. (2001). Guanylin in the human pancreas: a novel luminocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. *Histochem. Cell Biol.* 115, 131–145.
- Kullik, I., Giachino, P., and Fuchs, T. (1998). Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180, 4814–4820.
- Laarman, A.J., Ruyken, M., Malone, C.L., Striip, J.A.G. van, Horswill, A.R., and Rooijackers, S.H.M. (2011). *Staphylococcus aureus* Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *J. Immunol.* 186, 6445–6453.

Références

- Lai, H.J., Cheng, Y., Cho, H., Kosorok, M.R., and Farrell, P.M. (2004). Association between Initial Disease Presentation, Lung Disease Outcomes, and Survival in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Epidemiol.* *159*, 537–546.
- Lamoureux, C., Guilloux, C.-A., Beauruelle, C., Jolivet-Gougeon, A., and Héry-Arnaud, G. (2019). Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Crit. Rev. Microbiol.* *45*, 103–117.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* *10*, R25.
- Laura Kirwan (2019). Cystic Fibrosis Registry of Ireland.
- Le, K.Y., and Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front. Microbiol.* *6*, 1174.
- Lee, T.W.R., Brownlee, K.G., Conway, S.P., Denton, M., and Littlewood, J.M. (2003). Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* *2*, 29–34.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 1754–1760.
- Li, L., Abdelhady, W., Donegan, N.P., Seidl, K., Cheung, A., Zhou, Y.-F., Yeaman, M.R., Bayer, A.S., and Xiong, Y.Q. (2018). Role of Purine Biosynthesis in Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *J. Infect. Dis.* *218*, 1367–1377.
- Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D., and Ji, Y. (2005). Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *187*, 5486–5492.
- Lightbown, J.W., and Jackson, F.L. (1956). Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochem. J.* *63*, 130–137.

Références

- Limoli, D.H., and Hoffman, L.R. (2019). Help, hinder, hide and harm: what can we learn from the interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during respiratory infections? *Thorax* thoraxjnl-2018-212616.
- Limoli, D.H., Jones, C.J., and Wozniak, D.J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Limoli, D.H., Yang, J., Khansaheb, M.K., Helfman, B., Peng, L., Stecenko, A.A., and Goldberg, J.B. (2016). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 947–953.
- Limoli, D.H., Whitfield, G.B., Kitao, T., Ivey, M.L., Davis, M.R., Grahl, N., Hogan, D.A., Rahme, L.G., Howell, P.L., O’Toole, G.A., et al. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection. *MBio* 8, e00186-17.
- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R.P., and Vandenesch, F. (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28, 655–662.
- Lis, J.T., and Schleif, R. (1975). Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res.* 2, 383–389.
- Liu, D., Pozharski, E., Lepore, B.W., Fu, M., Silverman, R.B., Petsko, G.A., and Ringe, D. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* l-Aspartate Aminotransferase by (S)-4-Amino-4,5-dihydro-2-thiophenecarboxylic Acid Reveals “A Tale of Two Mechanisms”, *Biochemistry* 46, 10517–10527.
- Liu, Q., Yeo, W.-S., and Bae, T. (2016). The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes* 7.
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S., and Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 170–176.
- Loutet, S.A., and Valvano, M.A. (2010). A Decade of *Burkholderia cenocepacia* Virulence Determinant Research. *Infect. Immun.* 78, 4088–4100.

Références

- Lund-Palau, H., Turnbull, A.R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O., Wierre-Gore, N., Alton, E.W.F.W., Bundy, J.G., Connett, G., et al. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev. Respir. Med.* *10*, 685–697.
- Luong, T.T., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., and Lee, C.Y. (2006). Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *188*, 1899–1910.
- Machan, Z.A., Pitt, T.L., White, W., Watson, D., Taylor, G.W., Cole, P.J., and Wilson, R. (1991). Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: description of an antistaphylococcal substance. *J. Med. Microbiol.* *34*, 213–217.
- Machan, Z.A., Taylor, G.W., Pitt, T.L., Cole, P.J., and Wilson, R. (1992). 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *30*, 615–623.
- MacKenzie, T., Gifford, A.H., Sabadosa, K.A., Quinton, H.B., Knapp, E.A., Goss, C.H., and Marshall, B.C. (2014). Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. *Ann. Intern. Med.* *161*, 233–241.
- Makowska-Grzyska, M., Kim, Y., Wu, R., Wilton, R., Gollapalli, D.R., Wang, X.K., Zhang, R., Jedrzejczak, R., Mack, J.C., Maltseva, N., et al. (2012). *Bacillus anthracis* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in action: the first bacterial series of structures of phosphate ion-, substrate-, and product-bound complexes. *Biochemistry* *51*, 6148–6163.
- Marsland, B.J., and Gollwitzer, E.S. (2014). Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 827–835.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* *17*, 10–12.
- Marvig, R.L., Sommer, L.M., Molin, S., and Johansen, H.K. (2015). Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* *47*, 57–64.

Références

- Maselli, J.H., Sontag, M.K., Norris, J.M., MacKenzie, T., Wagener, J.S., and Accurso, F.J. (2003). Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr. Pulmonol.* *35*, 257–262.
- Mashburn, L.M., Jett, A.M., Akins, D.R., and Whiteley, M. (2005). *Staphylococcus aureus* Serves as an Iron Source for *Pseudomonas aeruginosa* during In Vivo Coculture. *J. Bacteriol.* *187*, 554–566.
- Mastroianni, M.D., Evans, N.P., Byrnes, M.K., Stevens, A.M., Robertson, J.L., and Melville, S.B. (2005). Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect. Immun.* *73*, 6055–6063.
- McCarthy, V.A., and Harris, A. (2005). The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr. Pulmonol.* *40*, 1–8.
- Melter, O., and Radojevič, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*-review. *Folia Microbiol. (Praha)* *55*, 548–558.
- Meng, X., Clews, J., Kargas, V., Wang, X., and Ford, R.C. (2017). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *74*, 23–38.
- Michelsen, C.F., Christensen, A.-M.J., Bojer, M.S., Hoiby, N., Ingmer, H., and Jelsbak, L. (2014). *Staphylococcus aureus* Alters Growth Activity, Autolysis, and Antibiotic Tolerance in a Human Host-Adapted *Pseudomonas aeruginosa* Lineage. *J. Bacteriol.* *196*, 3903–3911.
- Michelsen, C.F., Khademi, S.M.H., Johansen, H.K., Ingmer, H., Dorrestein, P.C., and Jelsbak, L. (2016). Evolution of metabolic divergence in *Pseudomonas aeruginosa* during long-term infection facilitates a proto-cooperative interspecies interaction. *ISME J.* *10*, 1323–1336.
- Michon, A.-L., and Marchandin, H. (2015). Diversité physiopathologique du microbiote respiratoire. </data/revues/1773035X/v2015i469/S1773035X15728200/>.
- Mickle, J.E., Milewski, M.I., Macek, M., and Cutting, G.R. (2000). Effects of cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens-associated mutations on

Références

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated regulation of separate channels. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1485–1495.

Milla, C.E., Billings, J., and Moran, A. (2005). Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care* 28, 2141–2144.

Mitchell, G., Séguin, D.L., Asselin, A.-E., Déziel, E., Cantin, A.M., Frost, E.H., Michaud, S., and Malouin, F. (2010). Staphylococcus aureus sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol.* 10, 33.

Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E.H., Cantin, A.M., and Malouin, F. (2013). SigB is a dominant regulator of virulence in Staphylococcus aureus small-colony variants. *PLoS One* 8, e65018.

Monaghan, K.G., and Feldman, G.L. (1999). The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially diverse North American population. *Prenat. Diagn.* 19, 604–609.

Moran, A., Dunitz, J., Nathan, B., Saeed, A., Holme, B., and Thomas, W. (2009). Cystic Fibrosis–Related Diabetes: Current Trends in Prevalence, Incidence, and Mortality. *Diabetes Care* 32, 1626–1631.

Moran Losada, P., Chouvarine, P., Dorda, M., Hedtfeld, S., Mielke, S., Schulz, A., Wiehlmann, L., and Tümmler, B. (2016). The cystic fibrosis lower airways microbial metagenome. *ERJ Open Res.* 2.

Morfeltdt, E., Taylor, D., von Gabain, A., and Arvidson, S. (1995). Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* 14, 4569–4577.

Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Kalaydjieva, L., et al. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nat. Genet.* 7, 169.

Muhlebach, M.S., Zorn, B.T., Esther, C.R., Hatch, J.E., Murray, C.P., Turkovic, L., Ranganathan, S.C., Boucher, R.C., Stick, S.M., and Wolfgang, M.C. (2018). Initial

Références

acquisition and succession of the cystic fibrosis lung microbiome is associated with disease progression in infants and preschool children. *PLOS Pathog.* *14*, e1006798.

Murray, J.L., Connell, J.L., Stacy, A., Turner, K.H., and Whiteley, M. (2014). Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J. Microbiol. Seoul Korea* *52*, 188–199.

Nadine Pellen (2012). Hasard, coïncidence, prédestination... et s'il fallait plutôt regarder du côté de nos aïeux? : analyse démographique et historique des réseaux généalogiques et des structures familiales des patients atteints de mucoviscidose en Bretagne.

Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., and Kaatz, G.W. (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* *37*, 128–129.

Nguyen, A.T., Jones, J.W., Ruge, M.A., Kane, M.A., and Oglesby-Sherrouse, A.G. (2015). Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *197*, 2265–2275.

Nguyen, A.T., Jones, J.W., Cámara, M., Williams, P., Kane, M.A., and Oglesby-Sherrouse, A.G. (2016). Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Retain Iron-Regulated Antimicrobial Activity against *Staphylococcus aureus* through the Action of Multiple Alkylquinolones. *Front. Microbiol.* *7*.

Nichols, D.P., and Chmiel, J.F. (2015). Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* *50 Suppl 40*, S39-56.

Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide Reductases. *29*.

Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 541–564.

Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* *12*, 3967.

Références

- Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 1)*, 185–198.
- O’Gara, J.P. (2017). Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. *Environ. Microbiol.* *19*, 3823–3833.
- van Opijnen, T., and Camilli, A. (2013). Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 435–442.
- Orazi, G., and O’Toole, G.A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection. *MBio* *8*, e00873–17.
- Pallett, R., Leslie, L.J., Lambert, P.A., Milic, I., Devitt, A., and Marshall, L.J. (2019). Anaerobiosis influences virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates and the interaction with *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* *9*, 6748.
- Palma, M., and Cheung, A.L. (2001). $\sigma(B)$ activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect. Immun.* *69*, 7858–7865.
- Palmer, K.L., Mashburn, L.M., Singh, P.K., and Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J. Bacteriol.* *187*, 5267–5277.
- Pantosti, A., Sanchini, A., and Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* *2*, 323–334.
- Paranjape, S.M., and Mogayzel, P.J. (2014). Cystic Fibrosis. *Pediatr. Rev.* *35*, 194–205.
- Pastar, I., Nusbaum, A.G., Gil, J., Patel, S.B., Chen, J., Valdes, J., Stojadinovic, O., Plano, L.R., Tomic-Canic, M., and Davis, S.C. (2013). Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE* *8*, e56846.

Références

- Pedemonte, N., Caci, E., Sondo, E., Caputo, A., Rhoden, K., Pfeffer, U., Di Candia, M., Bandettini, R., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., et al. (2007). Thiocyanate transport in resting and IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 5144–5153.
- Peng, X., Zhang, Y., Bai, G., Zhou, X., and Wu, H. (2016). Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 99, 945–959.
- Pernet, E., Guillemot, L., Burgel, P.-R., Martin, C., Lambeau, G., Sermet-Gaudelus, I., Sands, D., Leduc, D., Morand, P.C., Jeammet, L., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat. Commun.* 5, 5105.
- Pezzulo, A.A., Tang, X.X., Hoegger, M.J., Abou Alaiwa, M.H., Ramachandran, S., Moninger, T.O., Karp, P.H., Wohlford-Lenane, C.L., Haagsman, H.P., van Eijk, M., et al. (2012). Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 487, 109–113.
- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S.S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M.J., and Colledge, W.H. (1998). *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393, 79–82.
- Pistocchi, R., Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Sadakata, Y., Kobayashi, H., and Igarashi, K. (1993). Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* 268, 146–152.
- Ploton, M.-C., Abakka, S., Amouyal, E., Besnard, C., Dufour, L., Harrif, S.E., Kipnis, C., Prim, B., Vignot, J., and Houdouin, V. (2017). Le microbiote pulmonaire. </data/revues/0929693X/unassign/S0929693X17301768/>.
- Poole, K., Neshat, S., and Heinrichs, D. (1991). Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 1–5.
- Poolman Eric M, and Galvani Alison P (2007). Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J. R. Soc. Interface* 4, 91–98.

Références

- Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., and Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 295–305.
- Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O’Shea, P., Chhabra, S.R., Camara, M., and Williams, P. (2006). N-Acylhomoserine Lactones Antagonize Virulence Gene Expression and Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *74*, 910–919.
- Quinn, R.A., Whiteson, K., Lim, Y.-W., Salamon, P., Bailey, B., Mienardi, S., Sanchez, S.E., Blake, D., Conrad, D., and Rohwer, F. (2015). A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J.* *9*, 1052.
- Quintana-Gallego, E., Ruiz-Ramos, M., Delgado-Pecellin, I., Calero, C., Soriano, J.B., and Lopez-Campos, J.L. (2016). Mortality from cystic fibrosis in Europe: 1994-2010. *Pediatr. Pulmonol.* *51*, 133–142.
- Quinton, P.M., and Bijman, J. (1983). Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* *308*, 1185–1189.
- R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Raidt, L., Idelevich, E.A., Dübbers, A., Küster, P., Drevinek, P., Peters, G., and Kahl, B.C. (2015). Increased Prevalence and Resistance of Important Pathogens Recovered from Respiratory Specimens of Cystic Fibrosis Patients During a Decade. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *34*, 700–705.
- Ramsey, M.M., Freire, M.O., Gabriliska, R.A., Rumbaugh, K.P., and Lemon, K.P. (2016). *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front. Microbiol.* *7*.
- Rasigade, J.-P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B.A., Sapin, A., Lhoste, Y., Ranfaing, J., Badiou, C., Benito, Y., Bes, M., et al. (2013). PSMs of Hypervirulent

Références

Staphylococcus aureus Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. PLoS ONE 8.

Ratjen, F., and Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 361, 681–689.

Regassa, L.B., and Betley, M.J. (1992). Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 174, 5095–5100.

Regassa, L.B., Novick, R.P., and Betley, M.J. (1992). Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 60, 3381–3388.

Reichman, L.B., Hershfield, E.S., and Hershfield, E.S. (2000). *Tuberculosis: A Comprehensive International Approach, Second Edition*, (CRC Press).

Reyes, D., Andrey, D.O., Monod, A., Kelley, W.L., Zhang, G., and Cheung, A.L. (2011). Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193, 6020–6031.

Rodman, D.M., and Zamudio, S. (1991). The cystic fibrosis heterozygote--advantage in surviving cholera? *Med. Hypotheses* 36, 253–258.

Rosenfeld, M., Davis, R., FitzSimmons, S., Pepe, M., and Ramsey, B. (1997). Gender gap in cystic fibrosis mortality. *Am. J. Epidemiol.* 145, 794–803.

Roum, J.H., Buhl, R., McElvaney, N.G., Borok, Z., and Crystal, R.G. (1993). Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 75, 2419–2424.

Sagel, S.D., Gibson, R.L., Emerson, J., McNamara, S., Burns, J.L., Wagener, J.S., and Ramsey, B.W. (2009). Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* Infection on Inflammation and Clinical Status in Young Children with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* 154, 183-188.e3.

Saiman, L., Mehar, F., Niu, W.W., Neu, H.C., Shaw, K.J., Miller, G., and Prince, A. (1996). Antibiotic susceptibility of multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis, including candidates for transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 23, 532–537.

Références

- Saint-Criq, V., and Gray, M.A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 93–115.
- Santiago, M., Matano, L.M., Moussa, S.H., Gilmore, M.S., Walker, S., and Meredith, T.C. (2015). A new platform for ultra-high density *Staphylococcus aureus* transposon libraries. *BMC Genomics* 16.
- Saxild, H.H., and Nygaard, P. (1991). Regulation of levels of purine biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*: effects of changing purine nucleotide pools. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2387–2394.
- Schindler, B.D., Jacinto, P.L., Buensalido, J.A.L., Seo, S.M., and Kaatz, G.W. (2015). Clonal relatedness is a predictor of spontaneous multidrug efflux pump gene overexpression in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 464–470.
- Schirch, V., and Szebenyi, D.M. (2005). Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 482–487.
- Schneider, M., Mühlemann, K., Droz, S., Couzinet, S., Casaulta, C., and Zimmerli, S. (2008). Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1832–1834.
- Schultz, A., Puvvadi, R., Borisov, S.M., Shaw, N.C., Klimant, I., Berry, L.J., Montgomery, S.T., Nguyen, T., Kreda, S.M., Kicic, A., et al. (2017). Airway surface liquid pH is not acidic in children with cystic fibrosis. *Nat. Commun.* 8.
- Schwartbeck, B., Birtel, J., Treffon, J., Langhanki, L., Mellmann, A., Kale, D., Kahl, J., Hirschhausen, N., Neumann, C., Lee, J.C., et al. (2016). Dynamic in vivo mutations within the *ica* operon during persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients. *PLOS Pathog.* 12, e1006024.
- Schwerdt, M., Neumann, C., Schwartbeck, B., Kampmeier, S., Herzog, S., Görlich, D., Dübbers, A., Große-Onnebrink, J., Kessler, C., Küster, P., et al. (2018). *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*.

Références

- Scoffone, Trespidi, Chiarelli, Barbieri, and Buroni (2019). Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 1838.
- Scoffone, V.C., Chiarelli, L.R., Trespidi, G., Mentasti, M., Riccardi, G., and Buroni, S. (2017). Burkholderia cenocepacia Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Front. Microbiol.* *8*.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 2068–2069.
- Seggewiß, J., Becker, K., Kotte, O., Eisenacher, M., Yazdi, M.R.K., Fischer, A., McNamara, P., Al Laham, N., Proctor, R., Peters, G., et al. (2006). Reporter Metabolite Analysis of Transcriptional Profiles of a Staphylococcus aureus Strain with Normal Phenotype and Its Isogenic hemB Mutant Displaying the Small-Colony-Variant Phenotype. *J. Bacteriol.* *188*, 7765–7777.
- Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2008). Staphylococcus aureus CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* *76*, 2044–2050.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* *164*, 337–340.
- SenGupta, S., Hittle, L.E., Ernst, R.K., Uriarte, S.M., and Mitchell, T.C. (2016). A Pseudomonas aeruginosa hepta-acylated lipid A variant associated with cystic fibrosis selectively activates human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* *100*, 1047–1059.
- Shah, P., and Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* *68*, 4–16.
- Shi, T., Wang, Y., Wang, Z., Wang, G., Liu, D., Fu, J., Chen, T., and Zhao, X. (2014). Deregulation of purine pathway in Bacillus subtilis and its use in riboflavin biosynthesis. *Microb. Cell Factories* *13*, 101.
- Sibley, C.D., Duan, K., Fischer, C., Parkins, M.D., Storey, D.G., Rabin, H.R., and Surette, M.G. (2008). Discerning the Complexity of Community Interactions Using a Drosophila Model of Polymicrobial Infections. *PLoS Pathog.* *4*, e1000184.

Références

- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., et al. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 8487–8492.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., and Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 718–725.
- Sollid, J.U.E., Furberg, A.S., Hanssen, A.M., and Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infect. Genet. Evol.* *21*, 531–541.
- Sotirova, A.V., Spasova, D.I., Galabova, D.N., Karpenko, E., and Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr. Microbiol.* *56*, 639–644.
- Sousa, S.A., Ramos, C.G., and Leitão, J.H. (2011). *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *Int. J. Microbiol.* *2011*.
- de Souza, D. a. S., Faucz, F.R., Pereira-Ferrari, L., Sotomaior, V.S., and Raskin, S. (2018). Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology* *6*, 127–135.
- Stefani, S., Campana, S., Cariani, L., Carnovale, V., Colombo, C., Lleo, M.M., Iula, V.D., Minicucci, L., Morelli, P., Pizzamiglio, G., et al. (2017). Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int. J. Med. Microbiol.* *307*, 353–362.
- Steffes, C., Ellis, J., Wu, J., and Rosen, B.P. (1992). The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J. Bacteriol.* *174*, 3242–3249.
- Stephenson, A.L., Tom, M., Berthiaume, Y., Singer, L.G., Aaron, S.D., Whitmore, G.A., and Stanojevic, S. (2015). A contemporary survival analysis of individuals with cystic fibrosis: a cohort study. *Eur. Respir. J.* *45*, 670–679.
- Stephenson, A.L., Stanojevic, S., Sykes, J., and Burgel, P.-R. (2017). The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *Presse Médicale* *46*, e87–e95.

Références

- Strateva, T., and Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* *61*, 717–732.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., and Boucher, R.C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* *269*, 847–850.
- Supersac, G., Piémont, Y., Kubina, M., Prévost, G., and Foster, T.J. (1998). Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using *ahlg*-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* *24*, 241–251.
- Taccetti, G., Denton, M., Hayes, K., Drevinek, P., Sermet-Gaudelus, I., Bilton, D., Campana, S., Dolce, D., Ferroni, A., Héry-Arnaud, G., et al. (2019). A critical review of definitions used to describe *Pseudomonas aeruginosa* microbiological status in patients with cystic fibrosis for application in clinical trials. *J. Cyst. Fibros.* S1569199319308677.
- Tacconelli, E. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 7.
- Tiedeman, A.A., Smith, J.M., and Zalkin, H. (1985). Nucleotide sequence of the *guaA* gene encoding GMP synthetase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* *260*, 8676–8679.
- Tobacman, J.K. (2003). Does deficiency of arylsulfatase B have a role in cystic fibrosis? *Chest* *123*, 2130–2139.
- Tognon, M., Köhler, T., Gdaniec, B.G., Hao, Y., Lam, J.S., Beaume, M., Luscher, A., Buckling, A., and van Delden, C. (2017). Co-evolution with *Staphylococcus aureus* leads to lipopolysaccharide alterations in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.*
- Tognon, M., Köhler, T., Luscher, A., and van Delden, C. (2019). Transcriptional profiling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during in vitro co-culture. *BMC Genomics* *20*.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* *28*, 603–661.

Références

- Treffon, J., Block, D., Moche, M., Reiss, S., Fuchs, S., Engelmann, S., Becher, D., Langhanki, L., Mellmann, A., Peters, G., et al. (2018). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to Airway Environments in Patients With Cystic Fibrosis by Upregulation of Superoxide Dismutase M and Iron-Scavenging Proteins. *J. Infect. Dis.* *217*, 1453–1461.
- Tristan, A., Rasigade, J.-P., Ruizendaal, E., Laurent, F., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Etienne, J., Celard, M., Tattevin, P., et al. (2012). Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PloS One* *7*, e51172.
- Trouillet, S., Rasigade, J.-P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., and Laurent, F. (2011). A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J. Microbiol. Methods* *86*, 145–149.
- Truong-Bolduc, Q.C., and Hooper, D.C. (2010). Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *192*, 2525–2534.
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., and Hooper, D.C. (2005). MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *187*, 2395–2405.
- Truong-Bolduc, Q.C., Strahilevitz, J., and Hooper, D.C. (2006). NorC, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1104–1107.
- Truong-Bolduc, Q.C., Ding, Y., and Hooper, D.C. (2008). Posttranslational Modification Influences the Effects of MgrA on norA Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *190*, 7375–7381.
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Eidem, T., and Hooper, D.C. (2011). Transcriptional profiling analysis of the global regulator NorG, a GntR-like protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *193*, 6207–6214.

Références

- Truong-Bolduc, Q.C., Bolduc, G.R., Medeiros, H., Vyas, J.M., Wang, Y., and Hooper, D.C. (2015). Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *83*, 4362–4372.
- Truong-Bolduc, Q.C., Khan, N.S., Vyas, J.M., and Hooper, D.C. (2017). Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. *Infect. Immun.* *85*, e00862-16.
- Tsui, L.-C., and Dorfman, R. (2013). The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*, a009472.
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M.J., Cheung, A.L., et al. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog.* *11*, e1004870.
- Ulrich, M., Herbert, S., Berger, J., Bellon, G., Louis, D., Munker, G., and Döring, G. (1998). Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 83–91.
- Valentino, M.D., Foulston, L., Sadaka, A., Kos, V.N., Villet, R.A., Santa Maria, J., Lazinski, D.W., Camilli, A., Walker, S., Hooper, D.C., et al. (2014). Genes Contributing to *Staphylococcus aureus* Fitness in Abscess- and Infection-Related Ecologies. *MBio* *5*.
- Vankeerberghen, A., Cuppens, H., and Cassiman, J.-J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J. Cyst. Fibros.* *1*, 13–29.
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PloS One* *11*, e0157022.
- Vega, N.M., Allison, K.R., Samuels, A.N., Klempner, M.S., and Collins, J.J. (2013). *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14420–14425.

Références

- Venkataraman, A., Bassis, C.M., Beck, J.M., Young, V.B., Curtis, J.L., Huffnagle, G.B., and Schmidt, T.M. (2015). Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. *MBio* 6, e02284-14.
- Voggu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C., and Götz, F. (2006). Microevolution of cytochrome bd oxidase in Staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 188, 8079–8086.
- van de Vosse, E., Ali, S., de Visser, A.W., Surjadi, C., Widjaja, S., Vollaard, A.M., and van Dissel, J.T. (2005). Susceptibility to typhoid fever is associated with a polymorphism in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Hum. Genet.* 118, 138–140.
- Voyich, J.M., Otto, M., Mathema, B., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Welty, D., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Lina, G., et al. (2006). Is Pantone-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? *J. Infect. Dis.* 194, 1761–1770.
- Wakeman, C.A., Moore, J.L., Noto, M.J., Zhang, Y., Singleton, M.D., Prentice, B.M., Gilston, B.A., Doster, R.S., Gaddy, J.A., Chazin, W.J., et al. (2016). The innate immune protein calprotectin promotes *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* interaction. *Nat. Commun.* 7.
- Walton, W.G., Ahmad, S., Little, M.S., Kim, C.S.K., Tyrrell, J., Lin, Q., Di, Y.P., Tarran, R., and Redinbo, M.R. (2016). Structural Features Essential to the Antimicrobial Functions of Human SPLUNC1. *Biochemistry* 55, 2979–2991.
- Wang, H., Claveau, D., Vaillancourt, J.P., Roemer, T., and Meredith, T.C. (2011). High-frequency transposition for determining antibacterial mode of action. *Nat. Chem. Biol.* 7, 720–729.
- Ward, R.J., Crichton, R.R., Taylor, D.L., Della Corte, L., Srail, S.K., and Dexter, D.T. (2011). Iron and the immune system. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 118, 315–328.

Références

- Waters, V., and Amin, R. (2016). Antibiotic treatment for *Stenotrophomonas maltophilia* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016.
- Weimer, K.E.D., Armbruster, C.E., Juneau, R.A., Hong, W., Pang, B., and Swords, W.E. (2010). Coinfection with *Haemophilus influenzae* Promotes Pneumococcal Biofilm Formation during Experimental Otitis Media and Impedes the Progression of Pneumococcal Disease. *J. Infect. Dis.* 202, 1068–1075.
- Welsh, M.J., and Smith, A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73, 1251–1254.
- Whiley, R.A., Sheikh, N.P., Mushtaq, N., Hagi-Pavli, E., Personne, Y., Javaid, D., and Waite, R.D. (2014). Differential potentiation of the virulence of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis liverpool epidemic strain by oral commensal *Streptococci*. *J. Infect. Dis.* 209, 769–780.
- Whiteson, K.L., Bailey, B., Bergkessel, M., Conrad, D., Delhaes, L., Felts, B., Harris, J.K., Hunter, R., Lim, Y.W., Maughan, H., et al. (2014). The upper respiratory tract as a microbial source for pulmonary infections in cystic fibrosis. Parallels from island biogeography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1309–1315.
- William Venables (2016). nnet: Feed-Forward Neural Networks and Multinomial Log-Linear Models.
- Williams, P., and Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 182–191.
- Willner, D., Haynes, M.R., Furlan, M., Schmieder, R., Lim, Y.W., Rainey, P.B., Rohwer, F., and Conrad, D. (2012). Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J.* 6, 471–474.
- Wilson, R., Sykes, D.A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G.W., and Cole, P.J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect. Immun.* 56, 2515–2517.

Références

- Windmüller, N., Witten, A., Block, D., Bunk, B., Spröer, C., Kahl, B.C., and Mellmann, A. (2015). Transcriptional adaptations during long-term persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Med. Microbiol.* *305*, 38–46.
- Winstanley, C., and Fothergill, J.L. (2009). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol. Lett.* *290*, 1–9.
- Wolter, D.J., Emerson, J.C., McNamara, S., Buccat, A.M., Qin, X., Cochrane, E., Houston, L.S., Rogers, G.B., Marsh, P., Prehar, K., et al. (2013). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *57*, 384–391.
- Wolz, C., McDevitt, D., Foster, T.J., and Cheung, A.L. (1996). Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect. Immun.* *64*, 3142–3147.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* *109*, 317–325.
- Yamamoto, K., Oshima, T., Nonaka, G., Ito, H., and Ishihama, A. (2011). Induction of the *Escherichia coli* *cysK* gene by genetic and environmental factors. *FEMS Microbiol. Lett.* *323*, 88–95.
- Yang, L., Jelsbak, L., Marvig, R.L., Damkiær, S., Workman, C.T., Rau, M.H., Hansen, S.K., Folkesson, A., Johansen, H.K., Ciofu, O., et al. (2011a). Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7481–7486.
- Yang, L., Liu, Y., Markussen, T., Høiby, N., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S. (2011b). Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *62*, 339–347.
- Yao, X., and Lu, C.-D. (2014a). Characterization of *Staphylococcus aureus* Responses to Spermine Stress. *Curr. Microbiol.* *69*, 394–403.
- Yao, X., and Lu, C.-D. (2014b). Functional Characterization of the *potRABCD* Operon for Spermine and Spermidine Uptake and Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* *69*, 75–81.

Références

- Young, G. (1947). Pigment Production and Antibiotic Activity in Cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *54*, 109–117.
- Zemanick, E.T., Harris, J.K., Wagner, B.D., Robertson, C.E., Sagel, S.D., Stevens, M.J., Accurso, F.J., and Laguna, T.A. (2013). Inflammation and Airway Microbiota during Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *PLoS ONE* *8*.
- Zemanick, E.T., Wagner, B.D., Robertson, C.E., Ahrens, R.C., Chmiel, J.F., Clancy, J.P., Gibson, R.L., Harris, W.T., Kurland, G., Laguna, T.A., et al. (2017). Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* *50*.
- Zezi do Valle Gomes, M., and Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control* *25*, 441–447.
- Zhao, K., Du, L., Lin, J., Yuan, Y., Wang, X., Yue, B., Wang, X., Guo, Y., Chu, Y., and Zhou, Y. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing and Type VI Secretion System Can Direct Interspecific Coexistence During Evolution. *Front. Microbiol.* *9*.
- Zhao, L., Xue, T., Shang, F., Sun, H., and Sun, B. (2010). *Staphylococcus aureus* AI-2 Quorum Sensing Associates with the KdpDE Two-Component System To Regulate Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence. *Infect. Immun.* *78*, 3506–3515.
- Zhou, L., Wang, J., and Zhang, L.-H. (2007). Modulation of Bacterial Type III Secretion System by a Spermidine Transporter Dependent Signaling Pathway. *PLoS ONE* *2*, e1291.
- Zolin, Orenti, Naehrlich, and van Rens (2019). ECFS Patient Registry Annual Data Report 2017.