

Diversité phénotypique et moléculaire d'isolats urinaires de Pseudomonas aeruginosa

Agnès Cottalorda

► To cite this version:

Agnès Cottalorda. Diversité phénotypique et moléculaire d'isolats urinaires de Pseudomonas aeruginosa. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT: 2020NORMR028. tel-03080147

HAL Id: tel-03080147 https://theses.hal.science/tel-03080147

Submitted on 17 Dec 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.



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Diversité phénotypique et moléculaire d'isolats urinaires de Pseudomonas aeruginosa

Présentée et soutenue par Agnès COTTALORDA

Thèse soutenue publiquement le 5 novembre 2020 devant le jury composé de						
Monsieur Didier HOCQUET	Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon	Rapporteur				
Madame Anne-Marie ROGUES	Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteure				
Madame Sylvie CHEVALIER-LAURENCY	Professeur, Université de Rouen Normandie	Examinatrice				
Monsieur Jean-Nicolas CORNU	Professeur, Université de Rouen Normandie	Examinateur				
Madame Martine PESTEL-CARON	Professeur, Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse				
Madame Estelle JUMAS-BILAK	Professeur, Université de Montpellier	Codirectrice de thèse				

Thèse dirigée par le Professeur Martine PESTEL-CARON, Laboratoire GRAM 2.0 EA2656 Thèse codirigée par le Professeur Estelle JUMAS-BILAK, Laboratoire HSM UMR5569







Remerciements

A Monsieur le Professeur Didier Hocquet. A Madame le Professeur Anne-Marie Rogues. Vous me faîtes l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Professeur Sylvie Chevalier-Laurency. Vous me faîtes l'honneur d'examiner ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre accompagnement depuis mon Master 2.

A Monsieur le Professeur Jean-Nicolas Cornu. Je vous remercie de prendre part à ce jury de thèse et de me permettre de bénéficier de votre expertise clinique.

A Madame le Professeur Estelle Jumas-Bilak. Je vous remercie pour toutes ces années d'accompagnements, depuis mes premières années de faculté jusqu'à cet internat qui s'achève. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Martine Pestel-Caron. Il est difficile, Martine, de vous exprimer en quelques lignes toute ma gratitude ! Je ne saurais assez vous remercier pour votre gentillesse, votre confiance et votre disponibilité. Vous m'avez toujours soutenue, aidée, encouragée, remotivée, pour me permettre de m'épanouir professionnellement mais aussi de me dépasser pour mener à bien ce projet.

A Monsieur le Professeur François Caron. A Monsieur le Professeur Jean-Christophe *Plantier*. Je vous remercie pour votre acceuil au sein du laboratoire GRAM 2.0, où vous avez toujours eu à cœur de faire entendre « la voix des plus jeunes ».

A mes collègues du laboratoire GRAM 2.0.

A Sandrine, qui m'encadre depuis le master 2 ; une très belle recontre professionnelle mais aussi personnelle. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi ; toujours calme, bienveillante et souriante malgré les heures qui ont pu défiler à essayer d'appréhender la complexicité de Pyo et à s'y retrouver dans les diversités inter-hôtes, intra-patients et intraprélèvements. Un grand merci !

A Marie, qui après un passage aux Etats-Unis, nous a fait l'honneur d'amener son expertise en bactériologie. Un petit soleil parmi les heures parfois obscures de la bioinformatique ! Merci également pour ta bonne humeur, tes valeurs écologistes, ton âme de bonne vivante et tes caricatures.

A Maxime, qui m'a épaulé sur ce sujet. Pas facile en un an et un confinement de se mettre à jour sur ce sujet. Merci pour ta bonne humeur et ton aide précieuse, notamment sur l'encadrement et les données phénotypiques. Je te souhaite le meilleur pour ton nouveau poste !

A Stéphanie, un pilier du Gram, avec ta mémoire eidétique, tes talents artistiques (dont chacun à pu bénéficier avec le calendrier), ton calme et ton soutien inconditionnel !

A Jérémie, merci de m'avoir encadré durant le début de ce projet. Merci d'avoir pris du temps de m'épauler et me soutenir, et merci pour ces pauses *old-fashioned* ou post-congrès à Madrid.

A Julien, un personnage atypique mi-Johny mi-panda roux ; un patron en somme ! Merci pour tes conseils et pour tous ces moments de discussion partagés.

A Laurie, la nouvelle sudiste du laboratoire. Merci pour ta bonne humeur, malgré les quelques soufflements qui te caractérisent, qui précèdent et succèdent généralement l'heure du déjeuner et du goûter. Tu as été la première co-interne IPR avec laquelle j'ai pu travailler au quotidien, pour échanger sur la filière et nos projets, et partager nos expériences. Un grand soutien !

A Nicolas, le stagiaire devenu doctorant. J'ai eu le plaisir de te suivre depuis ton stage de L3 et de te voir évoluer au sein du laboratoire, en passant par les congélations interminables, les précipitats du milieu urinaire et les statistiques sous R. Merci pour ta gentillesse et tes talents de chanteur/danseur qui égayent les fins de journée.

A Chervin. Bienvenu dans l'équipe ! Et merci pour ton sourire et ton aide.

A Manu, Kévin et Elise. Merci pour votre expertise clinique, qui m'a beaucoup apporté pour parfaire l'analyse des données. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

A Anaïs. Merci pour tes conseils sur *P. aeruginosa,* une bactérie aussi complexe que passionnante !

A François et Simon Le Hello. Je vous remercie vivement pour votre expertise génomique, essentielle à ce projet !

Merci également à Sophie Boyer, Noëlle Frebourg et Ludovic Lemee, qui prennent toujours le temps de partager leurs expériences.

Merci aux collègues virologues rouennais et caennais du GRAM, notamment Elodie, Guillemette, Alice et Manon, pour vos sourires constants et vos bons conseils.

A toutes les personnes qui m'ont accompagnée durant cet internat.

A Madame le Professeur Véronique Merle et les membres du DPIAS. Je vous remercie pour la confiance que vous m'accordez en m'accueillant au sein de votre équipe.

A Christine Chefson-Girault et les membres du laboratoire d'Hygiène. Je remercie chacun d'entre vous pour votre accueil et votre bienveillance, qui m'ont permis d'allier dans les meilleures conditions possibles ce semestre hospitalier avec la fin de mon Doctorat.

Aux membres du service de bactériologie du CHU, qui m'ont aidée lors de la collection du souchier.

Aux membres de l'équipe HSM Physe. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux !

A toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et d'échanger, et qui ont rendu ce travail possible, notamment Agnès qui m'a permis de redécouvrir la chirurgie ; Aurore, nous aurons probablement l'occassion de retravailler ensemble ; et enfin les co-internes non-IPR parmi lesquels Nina, François, Guillaume, Léo et Louis !

A mes amis.

A Tinu et Blandine, deux merveilleuses rencontres de pharma ! Des associations aux soirées révisions, des discussions de balcon aux randonnées d'évasion...Que de bons moments ! Et malgré la distance, loin des yeux - près du cœur !

A Benoît, mon petit chercheur suisse ! Toujours autant de plaisir à te voir évoluer et t'épanouir à chaque fois que l'on se voit !

A Julien, Florian, Greg et Benoît. Même si la distance est parfois difficile, c'est toujours le même plaisir de se retrouver et de voir se préciser les nouvelles étapes de vos vies.

A Claire et Mickaël (et Martin !). Du buisson à Rouen, que de changement, mais surtout, que de bons moments !

Aux Gramy's, pour nos raclettes, nos terrasses Fée et nos soirées chorés/karaokés !

A ma famille.

A mes parents, qui m'apportent un soutien sans faille depuis toujours ! Merci d'être aussi présents et attentionés, à l'écoute et toujours de bons conseils. Jamais je n'y serai arrivée sans vous !

A Marie, Camille et Paul, une fratrie en or ! Merci pour tous ces moments de complicité, de fous-rires, dans grandes discussions, qui réchauffent le cœur et nous poussent en avant ! Et A la nouvelle génération !

A Micky, Sophie et Antoine, pour nos retrouvailles si attendues tout au long de l'année !

A ma belle famille, toujours si présente et attentionnée !

Une pensée à chaque membre de ma famille, présente et passée...

A *Nico*. Toi qui m'accompagnes depuis près d'une décennie, qui m'a épaulé et suivi durant ces longues études ; merci pour ta patience et tes attentions de chaque jour. A tous les jours qui nous attendent...

« Tout seul on va plus vite, ensemble, on va plus loin »

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Introduction générale	13
Revue de la littérature	15
I. Principales caractéristiques de Pseudomonas aeruginosa	15
I.1. Données générales	15
I.2. Données génomiques	16
I.3. Habitat et mode de vie	
I.4. Sensibilité aux antibiotiques	
I.4.1. Mécanismes de résistance	19
I.4.2. Epidémiologie de la résistance	
II. Infections à Pseudomonas aeruginosa	
II.1. Généralités	
II.2. Infections urinaires à <i>P. aeruginosa</i>	
III. Virulence et adaptation à l'hôte	
III.1. Généralités	
III.2. Particularités du milieu urinaire	
III.3. Le biofilm : un des principaux éléments de survie	
III.3.1. Formation du biofilm	
III.3.2. Composition du biofilm	
III.3.3. Core-proteome et core-transcriptome du biofilm	
III.4. Principaux facteurs de virulence	41
III.5. Régulation de la virulence et de la formation de biofilm	45
III.5.1. Quorum Sensing	
III.5.2. Seconds messagers	
III.5.3. Petits ARNs	50
III.5.4. Systèmes à deux composants et facteurs sigma	50
III.5.5. CRISPR	53
IV. Diversité génétique et adaptation à l'hôte	55
IV.1. Méthodes d'études	

IV.1.1. Typage moléculaire par multilocus sequence typing	55
IV.1.2. Séquençage de génome complet	57
IV.2. Epidémiologie moléculaire des infections à <i>P. aeruginosa</i>	59
IV.2.1. Données générales	59
IV.2.2. Epidémiologie moléculaire des IU	63
IV.3. Etudes longitudinales, évolution au cours du temps	64
IV.3.1. Evolution par mutations	64
IV.3.2. Evolution par insertions ou délétions	72
Travaux personnels	75
I. Introduction générale des travaux personnels	75
II. Premier travail personnel	79
II.1. Publication n°1	79
II.2. Principaux résultats	81
II.2.1. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients inclus dans la coh	orte
	81
II.2.1. Sensibilité des isolats aux antibiotiques	81
II.2.2. Typage par MLST	82
III. Second travail personnel	85
III.1. Publication n° 2	85
III.2. Principaux résultats	87
III.2.1. Données cliniques des patients	87
III.2.2. Profils de résistance aux antibiotiques	87
III.2.3. Adaptation moléculaire de <i>P. aeruginosa</i> au tractus urinaire	88
III.2.4. Impact des délétions génomiques sur le fitness et la formation de biofilm	88
Discussion générale	91
I. Diversité moléculaire et phénotypique des isolats urinaires de P. aeruginosa	92
II. Diversité moléculaire et phénotypique au sein d'un prélèvement	93
III. Diversité au cours du temps et adaptation à l'hôte	96
III.1. Principaux mécanismes moléculaires d'adaptation	96
III.2. Principales voies d'adaptation phénotypique de P. aeruginosa au tractus urinair	e 98
III.3. Associations génotypes-phénotypes	100
Conclusion générale	. 103
Références bibliographiques	. 105
Résumé / Abstract	. 123

Liste des figures

Figure 1 : Morphotypes des colonies de Pseudomonas aeruginosa
Figure 2: Pan-genome de P. aeruginosa déterminé par l'analyse de 1930 génomes17
Figure 3 : Mécanismes conférant à P. aeruginosa une résistance aux antibiotiques
Figure 4 : BLSE identifiées chez P. aeruginosa par le CNR entre 2014 et 2018
Figure 5 : Pourcentage de souches invasives de <i>P. aeruginosa</i> présentant une résistance
combinée aux antibiotiques selon les pays de l'Union Européenne
Figure 6 : Origine des souches de P. aeruginosa envoyées au CNR de Besançon en 2018 28
Figure 7 : Distribution des principaux sites infectieux identifiés dans le cadre de l'enquête de
prévalence des infections associées aux soins en établissements de santé, en France, en 2017
Figure 8 : Mécanismes de virulence déployés par P. aeruginosa au cours des infections 33
Figure 9 : Composition de l'urine
Figure 10 : Formation du biofilm chez P. aeruginosa
Figure 11: Composition et formation d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> à l'origine d'infection
urinaire
Figure 12 : Voies métaboliques surexprimées par 3 groupes (ou clusters) de souches en
conditions de biofilm
Figure 13 : Réponse des cellules résistantes (a), tolérantes (b) ou persistantes (c) à une
exposition à un antibiotique40
Figure 14 : Représentation schématique des interactions de <i>P. aeruginosa</i> avec les cellules
urothéliales et de leurs effets sur la physiologie de l'hôte au cours d'infections urinaires 41
Figure 15 : Modes de vie de <i>P. aeruginosa</i>
Figure 16 : Système de Quorum Sensing de P. aeruginosa : Hiérarchie et régulation des
facteurs de virulence
Figure 17 : Régulation de la virulence de <i>P. aeruginosa</i> par le système Gac/Rsm
Figure 18 : Réseaux de régulation permettant la transition d'une infection aiguë à une
infection chronique chez P. aeruginosa53
Figure 19 : Représentation schématique du principe du typage par MLST d'isolats de
P. aeruginosa
Figure 20 : Etapes du séquençage de génome complet
Figure 21 : Congruence des arbres phylogénétiques de 128 isolats de ST235 de P. aeruginosa
par cgMLST (A) et cgSNP (B)
Figure 22 : Distribution mondiale (A) et européenne (B) des souches de <i>P. aeruginosa</i> de
ST235, ST111 et ST175
Figure 23 : Structure de population d'isolats cliniques et environnementaux de <i>P. aeruginosa</i>
Figure 24 : Diversification de <i>P. aeruginosa</i> au sein des poumons de patients atteints de
$mucovisciaose \dots 65$
Figure 25: Reorganisation metabolique de <i>P. aeruginosa</i> au cours d'infections pulmonaires
chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose
Figure 20: Modalites de collection des isolats et analyses realisées au cours des deux études
au Doctorat

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des antibiotiques anti-Pseudomonas 21
Tableau II : Classification d'Ambler des β-lactamases chez P. aeruginosa
Tableau III: Principaux phénotypes et mécanismes de résistance aux antibiotiques de P.
aeruginosa25
Tableau IV : Profils de résistance aux antibiotiques des souches de P. aeruginosa26
Tableau V : Seuils de leucocyturie et de bactériurie des infections urinaires (IU) à P.
aeruginosa
Tableau VI : Facteurs de virulence de P. aeruginosa impliqués dans les infections urinaires 44
Tableau VII : Caractéristiques des trois principaux clones épidémiques de P. aeruginosa 62
Tableau VIII : Gènes pathoadaptatifs identifiés chez P. aeruginosa au cours d'études
longitudinales chez des patients atteints de mucoviscidose
Tableau IX : Principaux gènes impliqués dans la résistance mutationnelle de P. aeruginosa67

Liste des abréviations

AHL : N-acyl-homosérine lactone BA : Bactériurie Asymptomatique BLSE : β-Lactamase à Spectre Elargi CF : Cystic Fibrosis ou mucoviscidose cgMLST : core-genome MultiLocus Sequence Typing cgSNP : core-genome Single Nucleotide Polymorphism **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice CNR : Centre National de Référence DMU : Dispositif Médical Urinaire ECBU : Examen Cyto-Bactériologique des Urines eDNA : ADN extracellulaire EPS : ExoPolySaccharide HK : Histidine Kinase IAS : Infection Associée aux Soins IQS : Integrated Quorum sensing System IS : Séquence d'Insertion **IU**: Infection Urinaire IUAS : Infections urinaires associées aux soins

LPS : LipoPolySaccharide MDR : MultiDrug Resistant MLST : MultiLocus Sequence Typing PDR : PanDrug Resistant **PQS** : *Pseudomonas Quinolone Signaling* QRDR : Quinolone Resistant Determining Region QS : Quorum Sensing RR : Régulateur de Réponse RSCV: Rugose Small Colony Variant variant à petite colonie rugueuse SNP : Single Nucleotide Polymorphism sRNA :small RNA ST : Sequence Type T3SS : Type III secretion system TCA : acide tricarboxylique TCS : Système à deux composants WGS : Whole Genome Sequencing XDR : eXtensively Drug Resistant

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans les thématiques de recherche développées par le Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0 EA2656). Une de ces thématiques porte sur les infections urinaires à *Pseudomonas aeruginosa*; elle a pour objectifs d'étudier la diversité bactérienne et d'appréhender les mécanismes d'adaptation à l'origine d'une infection ou d'un échec thérapeutique. Ainsi, l'équipe de recherche s'attache à caractériser la diversité de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire et à explorer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la virulence, la résistance aux antibiotiques et ainsi la persistance chez l'hôte de ce micro-organisme responsable d'infections associées aux soins.

La première partie de ce manuscrit consiste en une revue générale des données de la littérature concernant *Pseudomonas aeruginosa*, les infections urinaires et les mécanismes d'adaptation à l'hôte de cette espèce.

Dans une seconde partie sont présentés nos travaux expérimentaux. Ils avaient pour objectifs (i) de décrire l'épidémiologie moléculaire et de la résistance des infections et colonisations urinaires à *Pseudomonas aeruginosa* et (ii) d'identifier les mécanismes associés à la persistance et à la microévolution de cette espèce au sein du tractus urinaire.

Revue de la littérature

I. Principales caractéristiques de Pseudomonas aeruginosa

I.1. Données générales

Pseudomonas aeruginosa, appelé également bacille pyocyanique, appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* au sein de la classe des *Gammaproteobacteria*. Cette espèce a été décrite pour la première fois dans un article scientifique en 1882, par Carle Gessard, comme l'agent responsable du pus de coloration bleue-verte dans le cadre d'infections cutanées (Pachori et al., 2019).

A l'examen direct, *P. aeruginosa* se présente sous la forme de bacilles à Gram négatif, isolés ou en diplobacilles. Il est très mobile grâce à une ciliature polaire. *P. aeruginosa* possède trois types de motilité, en milieu liquide, semi-solide (motilités de type *swimming* et *swarming*, médiées par le flagelle), ou solide (motilité de type *twitching*, médiée par les *pili* de type IV) (Kilmury and Burrows, 2018).

Cette bactérie non fermentaire est aérobie stricte et non exigeante, pouvant se développer à des températures variant de 30 °C à plus de 40°C (LaBauve and Wargo, 2012). Elle cultive facilement en 24h sur des milieux de culture ordinaires (Trypticase Soja) ou sélectifs (géloses contenant du Cétrimide).

Les colonies, possédant une odeur de seringa (également appelé jasmin des poètes), peuvent présenter différentes morphologies (D'Argenio et al., 2002; Hansen et al., 2012) (Figure 1).



Figure 1 : Morphotypes des colonies de Pseudomonas aeruginosa

L : colonies larges ; SCV : *small colony variants* ; M : colonies mucoïdes. D'après des données personnelles

Les colonies larges, extensives à contour irrégulier et d'aspect métallisé, sont fréquemment observées (Meybeck and Fantin, 2004). Elles caractérisent le morphotype sauvage, en opposition aux variants morphologiques identifiés au cours d'infections chroniques (Malhotra et al., 2019).

Les « small colony variant » (SCV) (Häußler, 2004; Malone, 2015) ou «rugose small colony variant » (RSCV) (Harrison et al., 2020) sont de petites colonies à bords réguliers, largement décrites durant les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (*cystic fibrosis*, CF). Il a été suggéré, au vu de leurs fortes prévalences au cours d'infections chroniques, que les RSCV puissent présenter un fitness ralenti et une virulence atténuée (Malone, 2015; Pestrak et al., 2018). Par ailleurs, les RSCV possèdent une forte capacité à former du biofilm et sont plus résistants aux antibiotiques ou aux effecteurs du système immunitaire de l'hôte (Pestrak et al., 2018; Malhotra et al., 2019).

Les colonies mucoïdes, d'aspect muqueux, lisse et bombé, présentent des caractéristiques proches de celles des RSCV (Malhotra et al., 2019). La conversion vers un morphotype mucoïde survient majoritairement au cours d'infections chroniques diverses (telles que les infections respiratoires), en lien avec une surproduction d'alginate (Malhotra et al., 2019). La conversion vers un phénotype mucoïde confère à la souche un avantage sélectif en termes de formation de biofilm et d'échappement au système immunitaire de l'hôte, bien que les avantages de cette conversion restent à ce jour controversés et partiellement compris (Malhotra et al., 2019). Cependant, au vu du coût énergétique d'une surproduction d'alginate, une réversion vers un phénotype non-mucoïde a été identifiée. De plus, de récentes études évoquent l'avantage d'une culture de colonies mucoïdes et non-mucoïdes face aux stress environnementaux (Malhotra et al., 2019).

P. aeruginosa est capable de produire plusieurs pigments, la pyocyanine (pigment bleuvert spécifique de l'espèce), la pyoverdine (pigment jaune-vert fluorescent) (Pachori et al., 2019), à l'origine du nom d'espèce *aeruginosa* signifiant vert-de-gris en latin, ou encore la pyorubine (pigment rouge) et la pyomélanine (pigment brun-noir) (Yabuuchi and Ohyama, 1972; Ogunnariwo and Hamilton-Miller, 1975; Rau et al., 2012).

I.2. Données génomiques

Du fait de son implication en clinique, le génome de *P. aeruginosa* fut parmi les premiers génomes complets séquencés (Marvig et al., 2015a). En effet, le premier génome complet de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, isolée dans un contexte d'infection cutanée, fut séquencé dans les années 2000. La taille importante (6,3Mpb) et la complexité de son génome (5.651 gènes), conférée notamment par la part importante de gènes régulateurs (8% du génome) (Oliveira et al., 2020), suggère une capacité d'adaptation évolutive de la souche, lui permettant de se développer dans divers environnements et de résister aux effets de

nombreuses molécules antibactériennes (Stover et al., 2000). En septembre 2020, 6.523 génomes assemblés de *P. aeruginosa* étaient disponibles sur la banque de données PATRIC 3.6.6 (https://www.patricbrc.org/search/?and(keyword(pseudomonas),keyword(aeruginosa))).

P. aeruginosa possède un grand génome (5-7 Mpb, médiane 6,6 Mpb), riche en GC (médiane 66,2%) (Moradali et al., 2017). Les génomes codent près de 6.101 protéines (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>). Le *pan-genome* de *P. aeruginosa* (ensemble des gènes décrits chez l'espèce) varie selon les études entre 10.000 et 40.000 gènes (Mielko et al., 2019; Ozer et al., 2019). Une étude récente réalisée à plus grande échelle sur 1.930 génomes séquencés a mis en évidence un *pan-genome* de 54.272 gènes et un *core-genome* (gènes communs à toutes les souches) de 665 gènes (Freschi et al., 2019) (Figure 2). L'identité nucléotidique moyenne au sein du *core-genome* de *P. aeruginosa* est supérieure à 98,5%, à l'exception de la souche PA7 qui présente une identité nucléotidique de 93,5% avec les souches PAO1, PA14 et LESB58 (Marvig et al., 2015a).



Figure 2: Pan-genome de *P. aeruginosa* déterminé par l'analyse de 1930 génomes Le *pan-genome* est constitué du *core-genome* et du génome accessoire. Le génome accessoire est constitué des gènes « uniques » (présents chez une seule souche) et des gènes « flexibles » (présents chez plusieurs souches). D'après (Freschi et al., 2019)

Le génome accessoire (gènes retrouvés uniquement chez quelques souches de l'espèce) est localisé au sein de 79 régions de plasticité génomique (Klockgether and Tümmler, 2017) et peut se composer d'éléments génétiques mobiles tels que les îlots génomiques (sur lesquels ont été identifiés phages, transposons et séquences d'insertions) (Marvig et al., 2015a). Freschi et son équipe ont identifié l'importance du transfert horizontal de gènes dans la diversité génomique de l'espèce. En effet, 18% des gènes du *pan-genome* étaient acquis par transfert horizontal de gènes ; 5% et 12% des plasmides contenaient des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence, respectivement (Freschi et al., 2019).

I.3. Habitat et mode de vie

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire de l'environnement (Magalhães et al., 2020), pouvant se développer chez l'Homme, les animaux, les végétaux ainsi que dans divers environnements, notamment aquatiques (Coggan and Wolfgang, 2012). L'hôpital constitue ainsi une niche favorable à son développement où différents réservoirs ont été identifiés, tels que les réseaux d'eaux (Abdouchakour et al., 2015) et les siphons des éviers (Varin et al., 2017; Magalhães et al., 2020). Il peut survivre de 6h à 6 mois sur des surfaces inertes (Pachori et al., 2019). Ces réservoirs ont été identifiés comme pouvant être à l'origine d'infections associées aux soins (IAS) (Magalhães et al., 2020).

P. aeruginosa est une bactérie versatile, possédant des propriétés d'adaptation à de nombreuses conditions physico-chimiques, lui permettant de survivre ou de s'adapter dans ces différents environnements (Kidd et al., 2012; Martins et al., 2014). Des souches environnementales isolées au sein de siphons et très proches phylogénétiquement (différant par moins de 14 mutations) ont ainsi pu être mises en évidence à près de 10 années d'intervalle (Magalhães et al., 2020).

P. aeruginosa possède plusieurs modes de vie, qui diffèrent entre eux par la morphologie et le métabolisme des bactéries (Olivares et al., 2019). Pour disséminer au sein de l'environnement, les bactéries peuvent adopter un mode de vie libre, dit planctonique. Chez l'Homme, ce mode de vie est préférentiellement exprimé lors des infections aiguës. Dès lors, la bactérie sera invasive pour disséminer rapidement, causant des lésions tissulaires à l'origine d'une réponse inflammatoire (Coggan and Wolfgang, 2012; Valentini et al., 2018). A l'inverse, les bactéries adoptant un mode de vie sessile se regroupent sous forme de communautés microbiennes, favorisant la formation de biofilm. Lors de la chronicisation des infections, la bactérie s'adapte à son environnement et se protège des systèmes de défense de l'hôte ou des traitements antibiotiques par formation de biofilm (Lebeaux et al., 2014; Gloag et al., 2019; Malhotra et al., 2019; Harrison et al., 2020).

Différents facteurs de virulence sont préférentiellement exprimés à chaque phase de l'infection ; ils seront décrits dans le chapitre III-4.

I.4. Sensibilité aux antibiotiques

I.4.1. Mécanismes de résistance

P. aeruginosa est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques par le biais de mécanismes intrinsèques. A ces mécanismes s'ajoutent des mécanismes de résistance acquise et adaptative (mécanismes transitoires induits par l'exposition aux antibiotiques), qui le rendent résistant à de nombreux antibiotiques naturellement actifs et restreignent ainsi les options thérapeutiques (Venier et al., 2012; World Health Organization, 2018) (**Figure 3**).



Figure 3 : Mécanismes conférant à P. aeruginosa une résistance aux antibiotiques

Pour chaque mécanisme, différentes stratégies moléculaires confèrent une résistance à différentes classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* (Car., Carbapénèmes ; Ceph., Céphalosporines ; Pen., Pénicillines ; Ami., Aminosides ; Flu., Fluoroquinolones ; Mac, Macrolides et Pol, Polymyxines), sont présentées en haut de la figure (soulignées). Les étoiles représentent les antibiotiques. CM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe.

Les mécanismes intrinsèques, tels que les barrières structurelles (par exemple l'EPS, substances polymères extracellulaires), la baisse de production d'OprD et la production basale de la β -lactamase AmpC et de pompes d'efflux MexAB/XY-OprM, confèrent une résistance à certaines familles d'antibiotiques.

La résistance acquise est liée à des mutations au sein du gène *oprD* ou de répresseurs transcriptionnels de gènes de résistance, de gènes cibles ou de gènes codant le lipopolysaccharide (LPS). Ces mutations confèrent une résistance à un grand nombre de familles d'antibiotiques. Lors de résistance à médiation plasmidique, une variété de gènes de résistance peut être transférée entre bactéries. La résistance aux polymyxines, due à des mutations génomiques ou des plasmides, est liée à la modification du LPS.

La résistance adaptative se produit en présence d'antibiotiques. Il s'agit d'un phénomène épigénétique transitoire et réversible, qui disparaîtra lorsque les antibiotiques seront éliminés. D'après (Moradali et al., 2017)

I.4.1.1. Résistance intrinsèque

Trois principaux mécanismes confèrent à *P. aeruginosa* une résistance naturelle aux antibiotiques en restreignant l'accès à leur cible thérapeutique (López-Causapé et al., 2018) : la faible perméabilité naturelle de sa membrane externe, la production de pompes d'efflux et la production d'une céphalosporinase chromosomique inductible AmpC.

Pour atteindre leur cible, les antibiotiques doivent pénétrer au sein de la cellule bactérienne. La membrane externe de *P. aeruginosa* représente une barrière sélective formée par une bicouche de phospholipides, de lipopolysaccharide (LPS) et de porines. La porine OprF est une porine non-spécifique, présente en conformation fermée chez plus de 95% de la population bactérienne. Cette porine confère à la membrane externe sa faible perméabilité (10 à 100 fois plus faible que celle d'*Escherichia coli*), limitant la pénétration d'antibiotiques hydrophobes au sein de la cellule bactérienne (Fito-Boncompte et al., 2011; Pachori et al., 2019; Pang et al., 2019).

Des systèmes d'efflux peuvent conférer à *P. aeruginosa* une résistance vis-à-vis de certains antibiotiques en facilitant l'export de ces molécules hors de la cellule bactérienne. *P. aeruginosa* produit près d'une douzaine de systèmes d'efflux distincts, bien que seuls deux participent activement à la résistance naturelle. Cette résistance est liée à la production constitutive de la pompe d'efflux MexAB-OprM et à la production inductible de MexXY-OprM (Poole, 2011; Oliver et al., 2015).

Enfin, *P. aeruginosa* produit une β -lactamase inductible à large spectre AmpC, dont l'expression est induite par certaines β -lactamines. La production de cette enzyme à un état basal confère une résistance vis-à-vis des aminopénicillines et de la majorité des céphalosporines (à l'exception de la ceftazidime, du céfépime et du ceftolozane) (Oliver et al., 2015).

Ainsi, *P. aeruginosa* est naturellement résistant à plusieurs familles de β -lactamines, telles que les aminopénicillines (comme l'amoxicilline, associée ou non à l'acide clavulanique), les céphalosporines de première et seconde génération, ainsi que certaines de troisième génération (cefotaxime, ceftriaxone) ou encore certains carbapénèmes (ertapénème) (Moradali et al., 2017). Les souches de *P. aeruginosa* sont également naturellement résistantes à certains aminosides (kanamycine, néomycine) en raison de la production d'une enzyme chromosomique modificatrice APH(3')-IIb, ainsi qu'aux quinolones de première génération, grâce à des systèmes d'efflux (Poole, 2005).

Ainsi, les principales molécules auxquelles *P. aeruginosa* est naturellement sensible et qui sont fréquemment utilisées dans les traitements sont listées dans le **Tableau I**.

Tableau I : Liste des antibiotiques anti-Pseudomonas								
Adapté de Y. V	Welker (12ème Journ	ée des Référents en Antibiothérapie, 2017) (Welker, 2017)						
	Antibiotiques anti-Pseudomonas							
ß-I	β-lactamines - Ticarcilline ± acide clavulanique - Pipéracilline ± tazobactam - Aztréonam - Ceftazidime - Céfépime - Imipénème							
No	Nouvelles β-lactamines - Ceftolozane/tazobactam - Ceftazidime/avibactam							
Ar	Aminosides - Gentamicine - Tobramycine - Amikacine							
Flu	uoroquinolones	CiprofloxacineLévofloxacine						
Αι	atres	 Colistine Polymyxine B Fosfomycine 						

I.4.1.2. <u>Résistance acquise</u>

A ces mécanismes de résistance naturelle peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise, en lien avec des mécanismes mutationnels au sein de gènes impliqués dans la résistance naturelle ou par transfert horizontal de gènes (Oliveira et al., 2020).

I.4.1.2.1. Mécanismes de résistance aux β-lactamines

La surproduction de pompe d'efflux, notamment MexAB-OprM, se caractérise par une résistance bactérienne à la ticarcilline (associée ou non à l'acide clavulanique) et à l'aztréonam (Poole, 2011).

L'altération de la porine OprD limite la pénétration des carbapénèmes à travers la membrane externe. Ce mécanisme de résistance peut être associé à une hydrolyse partielle des molécules par la céphalosporinase naturelle AmpC. Il touche principalement l'imipénème et dans une moindre mesure le méropénème (qui est plus stable à l'hydrolyse) (Pang et al., 2019).

Plusieurs β -lactamases ont été décrites chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes sont généralement regroupées en 4 classes (A, B, C et D) selon la classification d'Ambler (**Tableau II**).

Tableau II : Classification d'Ambler des β-lactamases chez P. aeruginosa

BLSE : β-lactamase à spectre étendu, ES-OXA : *Extended spectrum oxacillinase* ; ESAC : *Extended spectrum AmpC* ; PDC : *Pseudomonas Derived AmpC*. Adapté de (Berrazeg et al., 2015)

Enzymes		Quelques exemples	Classification d'Ambler	
Pénicillinase	Spectre restreint	TEM-, SHV-, PSE	А	
	BLSE	TEM-, SHV-2a, PER-, VEB-, GES		
Oxacillinase	Spectre restreint	OXA-1,-2, -10	D	
	BLSE (ES-OXA)	Dérivés d'OXA-1 : OXA-31		
		Dérivés d'OXA-2 : OXA-15,-34		
		Dérivés d'OXA-10 : OXA-11,-14		
Carbapénémase		IMP-, VIM-, NDM-, DIM	В	
		KPC-2, GES-4, -5	А	
		OXA-198	D	
Céphalosporinase	ESAC	PDC-44	С	

La résistance peut être liée à la surproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC. Des mutations dans le système de régulation de l'expression d'AmpC (*ampD*) entraînent une diminution de l'activité de son répresseur (*ampR*) (Oliver et al., 2015). La surproduction d'AmpC ou sa modification structurale sont à l'origine d'une résistance de la souche aux β -lactamines, telles que la ceftazidime (Horcajada et al., 2019). Il a été estimé que plus de 20% des isolats cliniques de *P. aeruginosa* présentaient une surproduction de la céphalosporinase AmpC (Horcajada et al., 2019).

La résistance acquise peut également être due à l'acquisition d'une pénicillinase, dont le déterminant génétique est porté par un plasmide ou un élément transposable de localisation chromosomique. La pénicillinase inactive les pénicillines mais la souche peut rester sensible aux associations comportant un inhibiteur de β -lactamases (tel que l'acide clavulanique ou le tazobactam) ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération (telles que la ceftazidime) et aux carbapénèmes (Pachori et al., 2019).

Des carbapénémases de type métallo-β-lactamases peuvent hydrolyser les carbapénèmes (Horcajada et al., 2019). Il existe une grande diversité d'enzymes hydrolysant les carbapénèmes (VIM, IMP, KPC, etc.) (Horcajada et al., 2019). La plus fréquemment recensée en France en 2018 était l'enzyme VIM-2 (représentant 59,1% des souches de *P. aeruginosa* productrices de carbapénémase envoyées pour expertise au centre national de référence [CNR] en 2018), majoritairement associée aux clones de *sequence type* (ST) 233 et de ST111 (59%) définis par *multilocus sequence typing* (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, 2018).

Les souches peuvent également produire des β-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE). Les gènes codant des BLSE sont souvent identifiés au sein d'intégrons de classe I (Horcajada et al., 2019) ou de plasmides (Oliveira et al., 2020). La répartition des souches productrices de BLSE varie de 1% à près de 50% selon les régions géographiques (Horcajada et al., 2019). Les BLSE les plus courantes en France en 2018 étaient les BLSE GES-1, SHV-2a, PER-1 et VEB-1a (BLSE de classe A) ainsi que les ES-OXA-35, ES-OXA-19 (BLSE de classe D) (**Figure 4**) (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, 2018).



I.4.1.2.2. Mécanismes de résistance aux aminosides

La surproduction de la pompe d'efflux MexXY-OprM confère aux souches bactériennes une résistance de bas niveau à l'ensemble des aminosides ainsi qu'à certaines fluoroquinolones ou β -lactamines (Poole, 2005, 2011; Pang et al., 2019).

Les résistances de haut niveau sont quant à elles plutôt liées à la production d'enzymes modifiant les aminosides. Ces modifications consistent en une phosphorylation (APH, *aminoglycoside phosphoryltransferase*), une acétylation (AAC, *aminoglycoside acetyltransferase*) ou encore une adénylation (ANT, *aminoglycoside nucleotidyltransferase*) (Poole, 2005). En parallèle de l'enzyme chromosomique APH(3)-IIb citée précédemment, les

principales enzymes plasmidiques acquises par *P. aeruginosa* sont les suivantes (Poole, 2005; Oliver et al., 2015) :

- L'enzyme ANT(2')-I, qui confère à la souche une résistance à la gentamicine et à la tobramycine ;
- L'enzyme AAC(3)-I, responsable de résistance isolée vis-à-vis de la gentamicine ;
- L'enzyme AAC(6')-Ib, conférant une résistance à l'amikacine et la tobramycine.

Enfin, des méthylases de l'ARNr 16S interfèrent dans la fixation des aminosides à la sous-unité 30S ribosomale, et sont à l'origine d'une résistance des souches à tous les aminosides (gentamicine, tobramycine et amikacine) utilisés en clinique. Les plus fréquemment décrites sont les méthylases RmtA, RmtB, RmtD et ArmA (Poole, 2011).

I.4.1.2.3. Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

La résistance des souches aux fluoroquinolones est principalement liée à des mutations au sein des gènes codant l'ADN gyrase ou l'ADN topoisomérase IV (López-Causapé et al., 2018; Oliveira et al., 2020), au niveau d'une région appelée *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR). Ceci conduit à une diminution d'affinité des fluoroquinolones pour leur cible et ainsi à un phénotype de résistance. Des résistances par surproduction de systèmes d'efflux (tels que MexAB-OprM) peuvent également être observées (Pang et al., 2019).

Ces mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent se combiner chez *P. aeruginosa.* Les principaux phénotypes de résistance sont décrits dans le **Tableau III**.

Tableau III: Principaux phénotypes et mécanismes de résistance aux antibiotiques de P.

aeruginosa

BLSE : β -lactamase à spectre étendu ; TIC : ticarcilline ; PIL : pipéracilline ; PTZ : pipéracilline + tazobactam ; CZD : ceftazidime ; FEP : céfépime ; ATM : aztréonam ; IMP : imipénème ; MEM : méropénème ; TMN : tobramycine ; AKN : amikacine ; LVX : lévofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; S : sensible ; I : intermédiaire ; R : résistant selon les concentrations critiques retenues par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM) et l'*European committee for antimicrobial susceptibility testing* (EUCAST) en 2012. Les cases non renseignées correspondent à la catégorie S. Adapté de (Mérens et al. 2012)

Antibiotiques	TIC	PIL	PTZ	CZD	FEP	ATM	IMP	MEM	TMN	AKN	LVX	CIP
Mutations												
Efflux MexAB-OprM surexprimé	R					R					I/R	S/I
Efflux MexXY-OprM surexprimé					S/R						I/R	S/I
Altération de la porine OprD							S/I	S/I				
Surproduction de la												
céphalosporinase AmpC	R	R	R	S/R	S/R	I/R						
Altération d'OprD + Surproduction												
d'AmpC	R	R	R	S/R	S/R	I/R	I/R	I/R				
Mutation des cibles GyrA, ParC											I/R	I/R
Acquisition de gènes												
β-lactamases												
Pénicillinases	R	S/R	S/R		S/R							
BLSE	R	S/R	S/R	R	R	R						
Métallo-β-lactamases	R	S/R	R	R	R	S/I	I/R	I/R				
Enzymes hydrolysant les												
aminosides									S/R	S/R		
Méthylase de l'ARNr 16S									R	R		

I.4.2. Epidémiologie de la résistance

Au vu de la capacité de *P. aeruginosa* à acquérir des multiples résistances aux antibiotiques, principalement lors d'IAS, un groupe international d'experts s'est réuni à l'initiative de l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) et des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dans le but de créer une terminologie internationale standardisée pour décrire des profils de résistance acquise aux antibiotiques (Magiorakos et al., 2012). Ces profils, largement repris par la suite dans la littérature (Horcajada et al., 2019; Oliveira et al., 2020), ont été définis selon la résistance d'une souche à une ou plusieurs familles d'antibiotiques (Tableau IV) :

- Profil MultiDrug Resistant (MDR) : résistance à 3 à 5 familles d'antibiotiques ;
- Profil *Extensively Drug Resistant* (XDR): résistance à au moins 6 familles d'antibiotiques;
- Profil PanDrug Resistant (PDR) : résistance à l'ensemble des antibiotiques testés.

Les isolats de phénotype sauvage ou résistants à 1 ou 2 familles d'antibiotiques sont catégorisés Non-MDR (Gomila et al., 2013).

Tableau IV: Profils de résistance aux antibiotiques des souches de P. aeruginosa

MDR : *MultiDrug Resistant* ; XDR : *Extensively Drug Resistant* ; I : Intermédiaire ; R : isolat Résistant à l'antibiotique testé. Adapté des données du Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques

Famil	les d'antibiotiques	Antibiotiques	Profils de résistance
I	Pénicillines	Ticarcilline-clavulanate Pipéracilline-tazobactam	
П	3 ^{ème} génération céphalosporines	Ceftazidime Céfépime	MDR : I or R ≥ 3
Ш	Monobactams	Aztréonam	groupes
IV	Carbapénèmes	lmipénème Méropénème Doripénème	XDR : I or R ≥ 6 groupes
V	Fluoroquinolones	Ciprofloxacine Lévofloxacine	
VI	Aminoglycosides	Amikacine Gentamicine Nétilmicine Tobramycine	PDR: I or R à tout
VII	Polymyxines	Colistine/Polymyxine B	
VIII	Autres	Fosfomycine	

De nombreuses épidémies hospitalières ont été identifiées de par le monde ces dernières décennies en lien avec des isolats MDR ou XDR. Le taux d'isolats MDR ou XDR est estimé entre 15 et 30% dans de multiples régions géographiques (Horcajada et al., 2019). Des données de typage ont identifié que ces isolats appartenaient à un nombre limité de

clones, appelés clones épidémiques à haut risque. Ces clones épidémiques à haut risque seront décrits plus précisément dans le chapitre IV.

En Europe, en 2018, 32,1% des isolats invasifs étaient résistants à au moins une famille d'antibiotiques. Le pourcentage de souches de *P. aeruginosa* ayant une résistance combinée (définie par une résistance à au moins 3 groupes d'antibiotiques parmi pipéracilline \pm tazobactam, ceftazidime, fluoroquinolones, aminosides et carbapénèmes) était de 12,8%, variant selon les pays de 0% (Islande) à 49,4% (Roumanie) (**Figure 5**). Le taux d'isolats résistants aux 5 groupes d'antibiotiques précédemment listés était de 4,1% en 2018 (ECDC, 2019).



D'après le rapport de 2019 de l'*European Center for Diseases Prevention* (ECDC, 2019)

En France en 2016, le taux de résistance d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* du « réseau Microbiologistes du Nord Pas de Calais » hospitalier (5.237 isolats, 36,8% respiratoires, 32,7% urinaires, 5,5% d'hémocultures et 25% d'autres sites anatomiques) variait de 11,5% (pour l'amikacine) à 46,9% (pour la ticarcilline). Le taux de souches multirésistantes (sensibilité intermédiaire ou résistance à la ticarcilline, la ceftazidime et l'imipénème) a diminué de 9,8% en 2008 à 6,6% en 2016 (ONERBA, 2018).

La résistance aux antibiotiques des souches urinaires de *P. aeruginosa* est particulièrement importante. En effet, en France en 2018, les souches urinaires représentaient

le principal contexte d'isolement (35%) des souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes envoyées pour expertise au CNR de Besançon (**Figure 6**) (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, 2018).



Figure 6 : Origine des souches de *P. aeruginosa* envoyées au CNR de Besançon en 2018 Proportion réalisée sur 955 souches de *P. aeruginosa* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes, pour lesquelles le CNR a été sollicité pour une recherche de carbapénémases et/ou de BLSE. D'après (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, 2018)

Ainsi, *P. aeruginosa* fait partie des pathogènes ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* sp.), responsables d'infections nosocomiales et qui échappent au traitement du fait de leur multirésistance aux antibiotiques (Boucher et al., 2009; Oliveira et al., 2020; Rice, 2008). L'Organisation Mondiale de la Santé a inclus cette espèce bactérienne dans le groupe critique de la liste des « agents pathogènes prioritaires », multirésistants aux antibiotiques, considérés parmi les plus menaçants pour la santé humaine et particulièrement dans les structures de soins (World Health Organization, 2018).

Néanmoins, les mesures d'hygiène et de surveillance, associées au bon usage des antibiotiques, ont permis de limiter l'émergence d'IAS causées par des souches multirésistantes de *P. aeruginosa*. En effet, bien que le taux de résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques demeure élevé, la mise en place de mesures préventives a permis de réduire de 29% les infections causées par des souches de *P. aeruginosa* de phénotype MDR aux Etats-Unis, entre 2013 et 2017 (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). En France, une diminution de la proportion d'infections nosocomiales causées par *P. aeruginosa* en 2017 a été observée par rapport à l'année 2012 (6,3% versus 8,4%) (CPias, 2018).

II. Infections à Pseudomonas aeruginosa

II.1. Généralités

Bactérie ubiquitaire, *P. aeruginosa* est généralement acquis depuis l'environnement (Parkins et al., 2018), bien qu'il puisse être isolé au sein de la flore commensale, au niveau digestif (2,6 à 24% des patients), rhino-pharyngé (0,6 à 6%) ou encore cutané (0 à 2%) (Lister et al., 2009).

Pathogène opportuniste, il est responsable d'infections de localisations diverses chez des patients ayant des défenses antibactériennes altérées. *P. aeruginosa* est ainsi responsable d'infections cutanées, oculaires, auriculaires, neuroméningées, de bactériémies mais cette espèce est principalement responsable d'infections respiratoires (particulièrement en réanimation ou chez les patients atteints de CF) et d'infections urinaires (IU) (Oliveira et al., 2020).

P. aeruginosa représente la seconde cause de pneumopathie nosocomiale et est la troisième espèce de bacille à Gram négatif la plus fréquemment identifiée au cours de bactériémie (Pachori et al., 2019). *P. aeruginosa* est responsable d'infections chez 60-80% des patients atteints de CF (Acosta et al., 2020). Lors d'une étude multicentrique française réalisée sur cinq mois, la prévalence des infections à *P. aeruginosa* en service de réanimation et soins intensifs était de 15,3% (Hoang et al., 2018).

P. aeruginosa est responsable de 10% des IAS et représente ainsi le quatrième pathogène nosocomial le plus fréquemment isolé au cours d'IAS, en France et dans le monde (Pachori et al., 2019; Daniau et al., 2020). En France, en 2017, les IU représentaient le site infectieux prédominant au cours d'IAS, avant les infections de sites opératoires ou les infections respiratoires (Daniau et al., 2020) (**Figure 7**).



Figure 7 : Distribution des principaux sites infectieux identifiés dans le cadre de l'enquête de prévalence des infections associées aux soins en établissements de santé, en France, en 2017 D'après (Daniau et al., 2020)

II.2. Infections urinaires à P. aeruginosa

La présence de microorganismes au sein de l'arbre urinaire peut être associée ou non à des manifestations clinico-biologiques, qui permettent de différencier les IU des bactériuries asymptomatiques (BA).

L'IU à *P. aeruginosa* est définie biologiquement lors d'examens cyto-bactériologiques des urines (ECBU) selon les seuils de bactériurie et de leucocyturie, variables selon le sexe et la présence ou non d'un dispositif médical urinaire (DMU) (**Tableau V**) (SPILF, 2015).

Tablaau V: Souile de louceouturie et de bactériurie des infections uringires (III) à P								
Tubleau V. Seulis de leucocyturie et de bacteriurie des infections urmanes (10) à F.								
aeruginosa								
Adapté des conférences de consensus et du référentiel en microbiologie (SF2H et al., 2015; SPILF, 2015; Société Française de Microbiologie, 2018)								
IU à P. aeruginosa	Présence de Dispositif Médical Urinaire (DMU) Seuil de significativité (ufc/ml)							
Leucocyturie	En l'absence	e de DMU	104					
En présence de DMU Pas de seuil								
Bactériurie	Bactériurie En l'absence de DMU			Homme				
			104	Femme				
		Dispositif endo-urinaire	10 ³ à 10 ⁵					
	En	Ponction sondage aller-retour, urétérostomie,	102	5 20				
	nrésence	pyélostomie, cytoscopie et urine pyélique						
	de DMU	Dérivations urétéro-iléales selon Bricker ou	Pas de seuil					
		néovessie	défini	5				
		Par ponction sus-pubienne	101					

Selon la classification de 2017 de la SPILF, *P. aeruginosa* appartient au groupe 2 des bactéries pouvant être responsables d'IU, c'est-à-dire au groupe « comprenant l'essentiel des bactéries uropathogènes (autres qu'*E. coli* et *Staphylococcus saprophyticus*) qui peuvent être responsables d'IU communautaires, mais sont plus habituellement impliquées dans des infections urinaires associées aux soins (IUAS) ou lorsqu'il existe des facteurs anatomiques ou iatrogènes favorisants ».

Les IUAS représentent 20-49% des IAS totales (Pachori et al., 2019; Daniau et al., 2020). Les principaux facteurs de risque de développer une IUAS sont la présence d'un cathéter urinaire (75% des IUAS) et la durée de sondage (Wagenlehner et al., 2012).

P. aeruginosa est responsable d'environ 10% des IU (Pachori et al., 2019). Comparativement à d'autres étiologies, les IU à *P. aeruginosa* surviennent préférentiellement chez des hommes de plus de 65 ans (Djordjevic et al., 2013; Zhang et al., 2014; Lamas Ferreiro et al., 2017; Gomila et al., 2018). En effet, la proportion des pathologies prostatiques augmente avec l'âge, pouvant altérer les fonctions urinaires et conduire à la pose de cathéter urinaire (Venier et al., 2012; Djordjevic et al., 2013; Pobiega et al., 2014). Près de 35% des IU sur DMU (Tielen et al., 2011) seraient causées par *P. aeruginosa*, en lien avec la formation de biofilm par *P. aeruginosa* sur les surfaces inertes du dispositif médical (Lebeaux et al., 2014; Olivares et al., 2019).

D'autres facteurs de risque d'IU à *P. aeruginosa* ont été identifiés, tels qu'une dérivation des voies urinaires naturelles, le diabète, l'alitement, des traitements par stéroïdes, un antécédent d'IU, d'antibiothérapie ou d'hospitalisation (Ledizet et al., 2012; Djordjevic et al., 2013; Zhang et al., 2014; Gomila et al., 2018).

Des procédures diagnostiques ou curatives ciblant le tractus urinaire ou une prise d'antibiotiques peuvent altérer le microbiome urinaire (Wolfe and Brubaker, 2015), et ainsi augmenter la sensibilité de l'hôte aux infections. En effet, l'urine, longtemps considérée comme stérile, n'est plus considérée comme telle (Mulder et al., 2019). Rani et *al.* (Rani et al., 2017) ont mis en évidence que l'antibiothérapie prophylactique, chez des patients ayant subi une transplantation rénale, pouvait significativement modifier la composition du microbiote urinaire, au profit d'une augmentation de la proportion d'espèces pathogènes telles qu'*E. coli* et d'une augmentation de la résistance aux antibiotiques de ces pathogènes.

Par ailleurs, une malformation du tractus urinaire, pouvant être la cause d'IU et d'antibiothérapies, a été décrite comme favorisant la survenue d'IU à *P. aeruginosa* par des souches multirésistantes aux antibiotiques (Gomila et al., 2018).

Enfin, une pathologie hépatique sévère (telle qu'une hépatopathie associée à une hypertension portale), un diabète, une insuffisance rénale sévère ou encore une antibiothérapie curative inadaptée étaient des facteurs de risque de mortalité (Lamas Ferreiro et al., 2017). Le taux de mortalité des IU à *P. aeruginosa* était de 33.9% (Lamas Ferreiro et al., 2017).

P. aeruginosa étant principalement responsable d'IAS, les recommandations de traitement des IU sont celles des IUAS (SF2H et al., 2015). Le choix du traitement repose sur l'historique du patient (prise d'antibiotiques récente, IUAS ou non, présence de DMU, etc.) et sur le profil de sensibilité des souches aux antibiotiques. Il est néanmoins recommandé de traiter 3 à 7 jours les cystites associées aux soins, 10 jours les pyélonéphrites, et de 10 à 14 jours les IU masculines (SF2H et al., 2015).

III. Virulence et adaptation à l'hôte

III.1. Généralités

Au sein de l'hôte, *P. aeruginosa* est soumis à différentes pressions de sélection, incluant la réponse immunitaire de l'hôte, la compétition inter-espèces pour l'oxygène et les nutriments, ou encore les traitements antibactériens. *P. aeruginosa* possède un vaste arsenal de facteurs de virulence et de gènes régulateurs, qui grâce à son large génome très plastique, lui permet de s'adapter et de survivre à diverses conditions physico-chimiques (Lee and Zhang, 2015; Moradali et al., 2017) (**Figure 8**).





III.2. Particularités du milieu urinaire

L'urine est un milieu complexe disposant de propriétés antimicrobiennes mais également source de nutriments (Mulder et al., 2019; Reitzer and Zimmern, 2019).

En effet, l'urine est un milieu hypertonique limité en oxygène et en fer, présentant un pH faible (proche de 6) (Ipe et al., 2016; Reitzer and Zimmern, 2019). Le métabolome urinaire comprend jusqu'à 2.651 métabolites (Reitzer and Zimmern, 2019) (**Figure 9**). Les principaux composants de l'urine sont l'urée et les électrolytes Na⁺, Cl⁻ ou K⁺; ils constituent près de 85% des solutés identifiés (Reitzer and Zimmern, 2019). La concentration en urée ainsi qu'en d'autres molécules antibactériennes, telles que les glycoprotéines Tamm-Horsfall, y est élevée

(Ipe et al., 2016). Des sources d'énergie sont disponibles au sein de l'urine et permettent la croissance bactérienne rapide (Reitzer and Zimmern, 2019). Parmi celles-ci figurent des sources de carbone (tels que les carbohydrates, les acides aminés ou les acides gras) ainsi que des intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (Reitzer and Zimmern, 2019).



Figure 9 : Composition de l'urine

Les principaux composés de l'urine sont présentés, à l'exception de l'urée (290mM), des ions Na+ (123mM), Cl- (115mM) et K+ (46mM). Les valeurs sont présentées en mM. D'après (Reitzer and Zimmern, 2019)

L'urine est un milieu très fluctuant, dont les variations peuvent être observées aussi bien entre les patients qu'au cours du temps chez un patient donné (Reitzer and Zimmern, 2019). L'IU peut survenir quand les concentrations en nutriments deviennent favorables (Reitzer and Zimmern, 2019).

Pour se développer au sein de cet environnement, *P. aeruginosa* doit adapter son métabolisme central en utilisant le lactate, le citrate et les acides aminés comme sources de carbone (Ipe et al., 2016). De plus, *P. aeruginosa* doit lutter contre la réponse immunitaire faisant suite à l'inflammation provoquée par la présence de bactérie au sein du tractus urinaire (Ipe et al., 2016).

Ainsi, la formation de biofilm et la production de divers facteurs de virulence contribuent, sous le contrôle de nombreux systèmes de régulation, au développement d'IU et à l'adaptation de *P. aeruginosa* à l'hôte.

III.3. Le biofilm : un des principaux éléments de survie

Le terme de biofilm a été employé pour la première fois en 1978 (Costerton et al., 1978). Il s'agit d'un « ensemble des micro-colonies entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides ». Il consiste en un consortium de micro-organismes (mono- ou multi-espèces) assemblés et localisés à une interface.

Les biofilms sont omniprésents (Lebeaux et al., 2014) et représentent un important mécanisme de protection de la bactérie vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques (Reichhardt and Parsek, 2019). Bien que le biofilm puisse se former sur tissus natifs, les infections en biofilm sont principalement observées en présence de dispositifs médicaux invasifs, tels que les matériaux ostéo-articulaires, les sondes endotrachéales ou les cathéters urinaires (Lebeaux et al., 2014). Les biofilms seraient impliqués dans 65% des infections microbiennes et dans plus de 80% des infections chroniques (Olivares et al., 2019).

La formation de biofilm représente l'une des stratégies bactériennes majeure pour l'établissement d'une IU (Tielen et al., 2013; Tolker-Nielsen, 2014). La capacité de formation de biofilm par *P. aeruginosa* est associée aux IU à risque de complications et à un mauvais pronostic de celles-ci (Tielen et al., 2013).

III.3.1. Formation du biofilm

Le biofilm se développe en plusieurs étapes. Le stade I consiste en un attachement réversible de bactéries ayant un mode de vie planctonique à une surface, attachement devenant irréversible lors du stade II via les adhésines de surface telles que les *pili* de type IV. Le stade III correspond à la production de la matrice extracellulaire et à la formation de micro-colonies. Les microcolonies sont délimitées par des canaux aqueux permettant l'apport d'oxygène et de nutriments ainsi que l'élimination des produits de dégradation. Le biofilm mature peut former une communauté en trois dimensions lors du stade IV, dont la configuration spatiale diffère dans le temps et l'espace. Les gradients d'oxygène et de pH sont à l'origine de l'hétérogénéité physiologique du biofilm. Ainsi, au sein du biofilm, les bactéries possèdent un fond génétique commun mais des propriétés physiologiques distinctes. Enfin, les bactéries peuvent se disperser lors du stade V pour retourner à un mode de vie planctonique et ainsi coloniser d'autres sites (**Figure 10**) (Rasamiravaka et al., 2015; Lee and Yoon, 2017; Olivares et al., 2019).


Les bactéries passent continuellement d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sessile, leur permettant de s'adapter rapidement aux conditions environnementales (Lee and Yoon, 2017). Cette évolution dynamique peut compliquer l'étude du biofilm (coloration au cristal violet en microplaques, *flow cell*, etc.) (O'Toole, 2011; Reichhardt and Parsek, 2019).

III.3.2. Composition du biofilm

Le biofilm consiste en une communauté bactérienne très structurée enchâssée au sein de substances polymères extracellulaires. Cette matrice est composée majoritairement d'exopolysaccharides(EPS) (alginate, Pel et Psl), d'ADN extracellulaire (eDNA), de lipides et de protéines. Les différents types d'EPS et l'eDNA interagissent dans l'architecture du biofilm (Lee and Yoon, 2017; Ciofu and Tolker-Nielsen, 2019). La matrice représente la majorité du volume du biofilm (50-90%), conférant une résistance physique et chimique aux forces mécaniques (telles que les fluides vasculaires) ou à la pénétration de molécules toxiques pour la bactérie (antibiotiques, molécules de l'immunité, etc.) (Gellatly and Hancock, 2013; Lebeaux et al., 2014).

Seules 1% des souches urinaires forment des colonies mucoïdes (par surproduction d'alginate) (Tielen et al., 2013). Ainsi, bien qu'impliqué dans la formation de biofilm, l'alginate joue un rôle mineur dans la formation de biofilm au sein du tractus urinaire (Newman et al., 2017). La stabilité structurelle du biofilm au niveau urinaire est de ce fait principalement médiée par les EPS Pel et Psl (Tielen et al., 2013). Par ailleurs, Cole et *al.*

(Cole et al., 2014) ont mis en évidence dans un modèle murin d'IU sur cathéter urinaire que *P. aeruginosa* pouvait former du biofilm par des mécanismes indépendants des EPS. En effet, un mutant délété des gènes *pel, psl* et *alg* était responsable d'une IU sur cathéter dans ce modèle, par formation de biofilm médié par l'eDNA. Par ailleurs, la pyocyanine peut se lier à l'eDNA et augmenter sa viscosité, favorisant le développement du biofilm au niveau urinaire (Newman et al., 2017).

Les rhamnolipides participent également à la formation de biofilm et au maintien de son intégrité structurelle. Leur expression est régulée positivement dans des environnements carencés en fer, où la formation de canaux aqueux permet la diffusion des nutriments au sein du biofilm. Ainsi, la production de rhamnolipides pourrait favoriser la persistance bactérienne de *P. aeruginosa* au cours d'IU (Newman et al., 2017) (Figure 11).



Figure 11: Composition et formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* à l'origine d'infection urinaire

P. aeruginosa est responsable d'IU notamment en présence de cathéter urinaire. La pyocyanine (PCN) en se liant à l'eDNA, augmente la viscosité du biofilm lors des premières étapes de formation. Les rhamnolipides (RHDL) favorisent la formation de microcolonies et participent à l'intégrité structurelle du biofilm. Au sein du biofilm, la forte densité cellulaire (*quorum sensing*, QS) favorise la communication via des molécules diffusibles (acyl-homosérines lactones, AHL). Ces AHL peuvent interagir directement avec l'urothélium pour altérer l'intégrité des jonctions serrées des cellules urothéliales. D'après (Newman et al., 2017)

Enfin, les bactéries en biofilm causent davantage de lésions rénales que les cellules planctoniques dans un modèle murin *in vivo* d'IU ascendante, probablement en permettant aux cellules d'échapper à la phagocytose (Mittal et al., 2009).

III.3.3. Core-proteome et core-transcriptome du biofilm

Une étude portant sur 138 isolats cliniques de *P. aeruginosa*, en conditions de biofilm, a permis d'identifier trois profils majoritaires de biofilm par microscopie confocale (Thöming et al., 2020). Ces trois profils différaient selon l'architecture plus ou moins structurée du biofilm de *P. aeruginosa*.

L'analyse du *core-transcriptome* de 77 isolats représentatifs de la diversité génétique a permis d'identifier une évolution convergente, 70 gènes régulés positivement étant communs aux trois profils (**Figure 12**).



Figure 12 : Voies métaboliques surexprimées par 3 groupes (ou clusters) de souches en conditions de biofilm

Le diagramme de Venn illustre les 70 gènes surexprimés chez les isolats des trois profils (cluster A, B et C) et ceux spécifiquement surexprimés au sein d'un profil donné (A : 388 gènes ; B : 33 gènes ; C : 85 gènes). D'après (Newman et al., 2017)

Une surexpression des gènes impliqués dans la synthèse de pyoverdine (*pvdAEGHLNOPQR*, *pvdS*) ou les systèmes de captures du fer (*fpvG*, *fepB*, *hasAp*, *phuR*, *prrF1*, *prrH*, *fiuI*) a été mise en évidence chez les isolats des trois profils, suggérant que le fer représente un élément central dans la formation du biofilm, indépendamment de sa structure. De plus, des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*sodM* codant une superoxyde dismutase et *fumC* codant une fumarate hydratase) étaient également surexprimés, suggérant que les cellules en biofilm sont soumises au stress oxydatif. Enfin, des gènes impliqués dans

le métabolisme énergétique (*exaABDE*, impliqués dans l'oxydation de l'éthanol) ou dans la dégradation de l'anthranilate (*antCBA*) ont été identifiés au sein du *core-transcriptome*. Ces gènes pourraient constituer des cibles dans la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* en biofilm (Thöming et al., 2020).

Parallèlement, l'étude des profils protéomiques de 27 isolats de *P. aeruginosa,* en conditions planctoniques et en biofilm, a permis de différencier ces deux modes de vie. De façon similaire à l'étude transcriptomique de Thöming et *al.* (Thöming et al., 2020), une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans l'acquisition et le métabolisme du fer (PchDG, FptA), le *quorum sensing* (PqsBCDH), les protéines de membrane (OprCFG, MexI) ou la synthèse de phénazines (PhzB1, PhzB2, PhzE2, PhzF2, PhzM) ou d'acides gras (FabG) a été mise en évidence chez les cellules en biofilm (Erdmann et al., 2019).

Ainsi, l'acquisition de fer semble représenter un challenge majeur pour les cellules en biofilm. Il est de plus intéressant de noter que dans ces deux études, les variations identifiées entre les cellules planctoniques et sessiles n'étaient pas liées à un fond génétique distinct des souches mais associées à des variations du niveaux d'expression des gènes ou des protéines, suggérant une régulation de la virulence complexe et à différents niveaux (Thöming et al., 2020).

III.3.3.1. Biofilm et récalcitrance aux antibiotiques

La survie des bactéries en biofilm face à un traitement antibiotique est appelée récalcitrance ; il regroupe deux phénomènes : la résistance et la tolérance (Lebeaux et al., 2014).

La résistance consiste en la survie des bactéries face à une pression de sélection d'un antibiotique. Elle est caractérisée par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Lebeaux et al., 2014). A l'inverse, la tolérance permet la survie d'une population bactérienne sans augmentation de la CMI (Lebeaux et al., 2014). La survie d'une sous-population (< 0,01%) à des taux élevés d'antibiotiques, caractérise les « cellules persistantes ». Les cellules persistantes sont par ailleurs capables de reprendre leur multiplication à l'arrêt de l'exposition à un antibiotique (Soares et al., 2020) (Figure 13). La tolérance représente ainsi l'une des causes majeures de la survie au long-cours des bactéries et des échecs thérapeutiques des infections en biofilm (Soares et al., 2020).



Figure 13 : Réponse des cellules résistantes (a), tolérantes (b) ou persistantes (c) à une

exposition à un antibiotique

(a) Les cellules résistantes sont caractérisées par une concentration minimale inhibitrice (CMI) plus élevée que les cellules sensibles vis-à-vis d'un antibiotique. (b) Les cellules tolérantes présentent la même CMI que les cellules sensibles aux antibiotiques mais le temps nécessaire pour lyser 99% de la population (*minimum duration for killing*, MDK₉₉) est augmenté. (c) Les souches persistantes ont les mêmes CMI et MDK₉₉ que les souches sensibles, mais le MDK_{99,99} est augmenté. D'après (Brauner et al., 2016)

III.4. Principaux facteurs de virulence

P. aeruginosa possède une pathogénicité multifactorielle en lien avec un vaste arsenal de facteurs de virulence. Il semble difficile de réaliser une liste exhaustive des facteurs de virulence de *P. aeruginosa,* aussi cette revue de la littérature sera focalisée sur les facteurs de virulence impliqués dans les phénomènes de colonisations ou d'infections urinaires (**Figure 14**).



Figure 14 : Représentation schématique des interactions de *P. aeruginosa* avec les cellules urothéliales et de leurs effets sur la physiologie de l'hôte au cours d'infections urinaires D'après (Newman et al., 2017)

Pour atteindre et coloniser le tractus urinaire, *P. aeruginosa* doit être mobile. Le flagelle constitue une ciliature polaire (Dasgupta et *al.* 2004) nécessaire à la mobilité ainsi qu'à l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte. C'est par ailleurs un composé bactérien très immunogène (Ben Haj Khalifa et al., 2011). Les *pili* de type IV, adhésines de surface, ont également un rôle clé dans cette première étape (Persat et al., 2015; Marko et al., 2018).

Une étude réalisée *in vitro* sur 30 isolats urinaires cliniques de *P. aeruginosa* (12 responsables d'IU et 18 d'IU en présence de cathéter urinaire) a montré que 90% des isolats

présentaient une motilité de type *swimming* et 70% de type *twitching*. La motilité de type *swarming* semblait cependant majoritairement associée à la phase aiguë de l'IU, bien que le nombre d'isolats de l'étude soit relativement limité (Tielen et al., 2011).

Au sein du tractus urinaire, *P. aeruginosa* doit faire face à un environnement limité en fer (Newman et al., 2017). Les sidérophores (tels que la pyoverdine, et la pyochéline) permettent la captation de fer, essentiel à la croissance bactérienne. La pyoverdine initie en outre une cascade de signalisation induisant la production de facteurs de virulence, dont l'exotoxine A et la pyoverdine elle-même (Jimenez et al., 2012). Elle est ainsi plus impliquée dans la virulence bactérienne que la pyochéline (Suzuki et al., 2018). Lors d'une étude menée sur 30 isolats urinaires (en présence ou non de cathéter urinaire), tous les isolats exprimaient la pyoverdine, suggérant son importance pour la survie de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire (Tielen et al., 2011).

Le système de sécrétion de type III (*type III secretion system*, T3SS) a un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa*. Quatre protéines effectrices (ExoS, ExoU, ExoT et ExoY), sont injectées dans les cellules hôtes au cours de l'infection. La protéine ExoU facilite la destruction des phagocytes et, conjointement avec ExoT, active les voies pro-apoptotiques et ainsi retarde la cicatrisation des cellules épithéliales (Newman et al., 2017). De plus, ExoU est très cytotoxique et associée à des infections respiratoires de mauvais pronostic ou à une mortalité accrue (Klockgether and Tümmler, 2017; Horcajada et al., 2019). La protéine ExoS, en perturbant le cytosquelette de l'actine, favorise la persistance de *P. aeruginosa* et l'évasion immunitaire. Bien qu'ExoY participe également à la perturbation du cytosquelette de l'actine, son rôle dans l'IU n'est pas clair à ce jour (Newman et al., 2017).

D'autres facteurs de virulence sécrétés, tels que la protéase alcaline ou l'élastase (LasA et LasB), causent des dommages tissulaires et contribuent à la chronicité de ces infections. Par ailleurs, la phospholipase C hémolytique, dont l'activité peut favoriser la disponibilité de fer au sein du tractus urinaire (Newman et al., 2017), est significativement plus produite par des isolats urinaires que par les isolats d'autres sites anatomiques (pulmonaires, sanguins) (Berka et al., 1981).

P. aeruginosa produit plusieurs phénazines qui améliorent la compétitivité dans les infections polymicrobiennes. La pyocyanine (PCN) réduit la viabilité des cellules urothéliales, probablement par génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine d'un stress oxydatif qui augmente la transcription de l'IL-6. La PCN provoque ainsi une sénescence des cellules urothéliales (Newman et al., 2017).

Les protéines Tamm-Horsfall (THP) de l'hôte ont un rôle préventif lors des IU, en se liant aux *pili* de type IV de *P. aeruginosa*. Néanmoins, les THP peuvent également se lier aux cathéters urinaires. Par action compétitive, la liaison des THP aux *pili* de *P. aeruginosa* est diminuée, renforçant l'évasion immunitaire de *P. aeruginosa* et le développement d'une IU (Newman et al., 2017).

Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* impliqués dans les IU sont listés dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Facteurs de virulence de P. aeruginosa impliqués dans les infections urinaires

D'après (Newman et al., 2017)

Virulence factor	Characteristics	Potential Role in UTIs
asA	Staphylolytic zinc metallopeptidase of the M23A family; has reduced elastolytic activity compared to LasB; enhances elastolytic activity of LasB	Aid breakdown of host tissues (including elastin in the urinary tract) which could facilitate invasion and/or amino acid metabolism
LasB	Zinc metalloprotease with the foremost elastolytic activity; necessary for activation of LasA	Biofilm formation; immunomodulation; Aid breakdown of host tissues (including elastin) and which could facilitate invasion and/or amino acid metabolism
Phospholipase A	Has activity that releases fatty acids from phospholipid substrate whereas phospholipase C releases phosphate esters; found commonly in UTI isolates	Could be implicated in apoptosis of host cells; possible generation of ROS
Phospholipase C	Haemolytic (plcH) and non-haemeolytic (plcN) versions; Both hydrolyze phosphatidylcholine; plcH hydrolyzes sphingomyelin and phosphatidylcholine; plcN hydrolyzes phosphatidylserine and phosphatidylcholine	Haemolytic activity could aid iron availability in the iron scarce urinary tract
Phospholipase D	Secreted by H2 Type VI system; implicated in bacterial competition, chronic infection and eukaryotic cell invasion	Could aid persistence and/or invasion in the urinary tract
ExoS	Bifunctional type-III cytotoxin; almost never found in strains expressing ExoU; disrupts actin cytoskeleton; ADP-ribosylates broader range of host proteins than ExoT	Levels increase over time in UTIs, could aid persistence and immune evasion
ExoT	Bi-functional type-III cytotoxin; induces mitochondrial apoptosis in host cells; disrupts actin cytoskeleton	Could aid immune evasion
ExoU	Type-III toxin; extremely cytotoxic phospholipase; almost never found in strains expressing ExoS	Some UTI isolates found with ExoU and low cytotoxicity; ExoU may serve other function or be a hindrance
ЕхоҮ	Type-III toxin with adenylate cyclase disrupting actin cytoskeleton; enhances production of the second messengers cGMP and cUMP in host cells	Unclear
Exotoxin A	Toxin Inhibits eukaryotic protein synthesis via ADP ribosylation of elongation factor 2 which can lead to cell lysis; stimulates inflammation and hepatotoxicity in animals; positively regulated by iron starvation and ToxR	Could aid immune evasion; stimulation of inflammation in the kidney could aid persistence
Alkaline protease	Type I secreted zinc metalloprotease; degrades host immune complements C1q, C2, C3 and cytokines IFN- γ and TNF- α	Increase iron availability via breakdown of transferrin; enhance amino acid metabolism via protease activity; aid immune evasion
Pyoverdine and pyochelin (siderophores)	Main mechanisms for iron uptake and therefore survival in many environments. Pyoverdine displays high levels of diversity and the highest affinity for iron. Pyochelin has lower affinity but has been implicated in chronic infection and is association with pyocyanin	Urine, particularly in the bladder, is a low iron environment and siderophores would facilitate bacterial growth
Alginate	An O-acetylated linear polymer of d- mannuronate and l- guluronate residues (Evans and Linker 1973). Alginate overproduction (mucoidy) has been associated with chronic infection isolates from the CF lung. Alginate contributes to biofilm architecture but is not essential for biofilm formation (Stapper et al. 2004)	Although alginate plays a role in biofilm formation, the contribution of alginate in the urinary tract is thought to be minimal
Pyocyanin	Type-II secreted, redox-active zwitterion; cytotoxic; blue at physiological pH	May impair ability of urothelial cells to repair and cause pain and urinary urgency in infection: induce inflammation

III.5. Régulation de la virulence et de la formation de biofilm

Le réseau de signalisation intervenant dans la régulation de la virulence chez *P. aeruginosa* est sûrement l'un des plus complexes connus à ce jour. Il consiste en plusieurs systèmes interconnectés qui régulent de façon coordonnée la virulence (Jimenez et al., 2012). De plus, plusieurs systèmes de régulation (au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel) permettent d'assurer les transitions entre les modes de vie planctonique et sessile (Figure 15) par coordination étroite de l'expression de centaines de gènes (Coggan and Wolfgang, 2012; Valentini et al., 2018). Ainsi, interviennent le *quorum sensing* (QS), des seconds messagers, de petits ARNs (sRNA), des systèmes à deux composants (TCS) ou des bactériophages.



Figure 15 : Modes de vie de P. aeruginosa

L'interaction des 4 voies régulatrices globales (cAMP, c-di-GMP, QS et Gac/Rsm) conduit à un continuum phénotypique qui contrôle la transition entre le mode de vie planctonique et sessile dans l'environnement et joue un rôle analogue chez l'homme en contrôlant la transition entre infection aiguë et chronique.

1. Mode de vie planctonique dans l'environnement

2. Activation du QS dès que la densité de population augmente, vie en groupe

3.4.5. Etapes de formation de biofilm après interaction avec une surface solide

6. Libération d'une cellule sessile à partir du biofilm et retour à un mode de vie planctonique

D'après (Coggan and Wolfgang, 2012)

III.5.1. Quorum Sensing

Le QS est le principal mécanisme de régulation de la virulence de *P. aeruginosa*. En fonction de la densité cellulaire (*quorum*) les bactéries peuvent communiquer entre elles (*sensing*) via des molécules diffusibles (les N-acyl-homosérines lactones [AHL] par exemple). Le QS joue un rôle critique dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* au cours d'une infection. Plus de 10% des gènes de *P. aeruginosa* sont régulés par le QS. Ces gènes sont principalement impliqués dans la production de facteurs de virulence, la motilité bactérienne, la transition du mode de vie planctonique au mode sessile et la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques ou encore les voies de réponse au stress (Lee and Zhang, 2015; Moradali et al., 2017).

Plusieurs effecteurs du QS ont été décrits : le système Las (composé d'une AHL synthase LasI et d'un régulateur transcriptionnel LasR), le système Rhl (composé sur le même modèle de RhlI et RhlR) et plus récemment le *Pseudomonas Quinolone Signaling* PQS (chez lesquels la molécule signal est une quinolone) et le système *Integrated QS System* IQS. Dans ce circuit de régulation, les protéines signal agissent comme des régulateurs transcriptionnels pour induire l'expression d'autres gènes tels que les gènes de virulence, en réponse à un stress environnemental (Lee and Zhang, 2015).

Le système Las contrôle la production de multiples facteurs de virulence impliqués dans les infections aiguës et les dommages cellulaires, notamment l'élastase, l'exotoxine A ou encore la protéase alcaline.

Le système Rhl induit l'expression de gènes impliqués dans la production de rhamnolipides et réprime l'expression de ceux impliqués dans l'assemblage et le fonctionnement du SST3 (Jimenez et al., 2012).

Ces deux systèmes pourraient jouer un rôle central dans les IU. En effet, l'activité du QS a été identifiée *in vitro* chez tous les isolats urinaires d'une étude, suggérant son importance au cours des IU (Tielen et al., 2011; Newman et al., 2017). De plus, les isolats délétés des systèmes *las* et *rhl* produisaient des biofilms moins volumineux, pouvant limiter leur pathogénicité lors d'IU sur cathéter (Newman et al., 2017). Néanmoins, ces données restent controversées. En effet, Cole *et al.* (Cole et al., 2018) ont montré que l'urine inhibait les voies métaboliques régulées par le QS (en limitant la perception bactérienne des AHL). De plus, les isolats délétés des systèmes *las* et *rhl* colonisaient le tractus urinaire de façon similaire aux isolats sauvages dans un modèle murin d'IU sur cathéter (Cole et al., 2018).

Le système PQS, lui, régule positivement la production de facteurs de virulence tels que la pyocyanine, et la capture du fer. En effet, le groupe hydroxyle du système PQS permet sa liaison au fer. L'accumulation de fer à proximité de la membrane permet à la cellule bactérienne d'acquérir le fer nécessaire à sa croissance, tout en maintenant ses sidérophores dans son environnement proche (Jimenez et al., 2012). Bala et *al.* (Bala et al., 2014) ont par ailleurs montré que des souches délétées des gènes *pqsH* et *pqsA* étaient moins présentes au niveau rénal et causaient moins de lésions tissulaires que les souches sauvages responsables de pyélonéphrites aiguës.

Le système IQS a récemment été décrit comme impliqué dans la virulence, en induisant l'expression de gènes codant la pyocyanine, l'élastase et les rhamnolipides. De plus, il peut suppléer partiellement le système Las dans des conditions physiologiques pauvres en phosphate (Ciofu et al., 2010; Lee and Zhang, 2015).

Ces systèmes de QS agissent selon une hiérarchie. Le système *las* régule positivement les systèmes *rhl* et PQS. Le système *rhl* régule négativement le système PQS (Coggan and Wolfgang, 2012) (Figure 16).

Trois systèmes de régulation du taux d'AHL ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. RsaL est un répresseur transcriptionnel du système Las, se liant en parallèle sur le complexe LasR-AHL au niveau de la région promotrice *lasI* afin d'inhiber sa transcription, ainsi que sur les régions promotrices des gènes codant la pyocyanine et l'acide cyanhydrique. QteE quant à lui prévient l'accumulation post-translationnelle de LasR en diminuant sa stabilité et en bloquant l'accumulation de RhIR par un mécanisme à ce jour inconnu. Enfin, QsIA prévient l'activation précoce du QS en formant des complexes avec LasR, bloquant sa liaison à l'ADN cible (Jimenez et al., 2012).



Figure 16 : Système de *Quorum Sensing* de *P. aeruginosa* : Hiérarchie et régulation des facteurs de virulence

(A) A ce jour, quatre voies de signalisation, incluant Las, Rhl, Pqs et IQS, ont été décrites parmi le QS de P. aeruginosa, LasR étant la principale. En réponse à des stimuli ou stress spécifiques, des auto-inducteurs (AI) différents sont synthétisés pour chaque système : HSL (3-oxo-C12-homosérine lactone), BHL (N-butyrylhomosérine lactone ou C4-HSL), PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) [2-(2-hydroxyphényl)thiazol-4-carbaldéhyde (aéruginaldéhyde)]. et IOS L'exportation et l'importation des auto-inducteurs HSL, BHL et PQS sont respectivement assurées par les pompes d'efflux MexAB-OprM/MexEF-OprN, la libre diffusion ou les vésicules membranaires. Le point d'interrogation indique une voie inconnue de transport pour le système IQS. Les systèmes sont distincts mais peuvent interagir entre eux (lignes pointillées). Les régulateurs transcriptionnels (LasR, RhlR et PqsR) sont activés par les AI pour induire l'expression de leur synthase respective (LasI, RhII, PqsABCDH) ainsi que l'expression de gènes codant des facteurs de virulence. La voie de signalisation du système IQS n'a pas encore été élucidée et le récepteur de l'IQS n'a pas encore été identifié.

Différents systèmes de sécrétion, principalement les systèmes de sécrétion de type 1 et 2 (T1SS/T2SS) ainsi que la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ assurent la sécrétion des facteurs de virulence.

(B) L'expression du QS est proportionnelle à la densité cellulaire et donc à la production cumulative d'AI (indiqués sur le schéma par de petits cercles colorés). Ce système permet une réponse collective de la population bactérienne en réponse à des stimuli environnementaux.

AprA, protéase alcaline ; Pyd, pyoverdine ; PLC, phospholipase C ; Tox, toxine A ; LasA, élastase LasA ; LasB, élastase LasB ; HCN, acide cyanhydrique ; Pyo, pyocyanine ; Rhld, rhamnolipides ; Lec A, lectine A ; CM, membrane cytoplasmique ; OM, membrane externe.

D'après (Moradali et al., 2017)

III.5.2. Seconds messagers

Aux signaux de communication liés à la diffusion de molécules chimiques s'ajoutent des signaux liés aux seconds messagers (Jimenez et al., 2012).

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est produite par des adénylates cyclases. Elle se lie au régulateur Vfr (*virulence factor regulator*), induisant la production de facteurs de virulence (exotoxine A, *pili* de type IV, SST3) et l'expression des systèmes Las ou Rhl. Le taux d'AMPc est régulé par le cluster de gènes *Chp* (*chemotaxis-like chemosensory system*). A noter que des mutations au sein du gène *mucA*, à l'origine d'une activation d'AlgU, inhibent cette voie de signalisation AMPc-Vfr (Coggan and Wolfgang, 2012; Jimenez et al., 2012).

L'AMPc est un médiateur majeur d'expression des gènes de virulence impliqués dans la phase aiguë de l'infection (mode de vie planctonique des bactéries). Néanmoins, de récentes études tendent à démontrer le rôle de la voie de signalisation AMPc-Vfr dans la formation de biofilm (Persat et al., 2015; Liu et al., 2020), confirmant la complexité de la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*.

Le di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) est un second messager impliqué dans la transition du mode de vie planctonique au mode de vie sessile par formation de biofilm (Valentini and Filloux, 2016). Il est synthétisé par une diguanylate cyclase (contenant un domaine GGDEF) et dégradé par une phosphodiestérase (contenant un domaine EAL). Chez *P. aeruginosa*, plus de 40 protéines contiennent un domaine GGDEF et/ou EAL, parmi lesquelles FimX (nécessaire à la formation des *pili* de type IV), FleQ (régulateur flagellaire), RsmA (du système Gac/Rsm) ou encore le système chémosensoriel Wsp (Jimenez et al., 2012; Cole et al., 2014; Klockgether and Tümmler, 2017; Gloag et al., 2019). Le niveau d'expression du c-di-GMP est par ailleurs corrélé à la formation de SCV. Cette molécule a ainsi été décrite comme impliquée dans les infections chroniques ou sur dispositifs médicaux, telles que les IU sur cathéter urinaire (Cole et al., 2014).

III.5.3. Petits ARNs

Les sRNA régulent finement l'expression et l'activité de nombreux régulateurs essentiels pour la bactérie. Le génome de la souche PAO1 *P. aeruginosa* code 34 sRNA (Balasubramanian et al., 2013). Les sRNA, par liaison à l'ADN, l'ARNm ou une protéine, sont à l'origine d'une régulation post-transcriptionnelle (Balasubramanian et al., 2013).

Chez *P. aeruginosa,* les sRNA RhlS, RsmV, et PhrD sont impliqués dans la régulation du QS et la formation de biofilm, alors que ReaL joue un rôle dans la virulence (par régulation négative de RpoS et ainsi de la production de facteurs de virulence). Ainsi, ils rendent possible l'adaptation rapide aux changements de conditions environnementales, telles que le pH acide, le stress oxydatif, ou encore l'immunité nutritionnelle. Les sRNA PrrF1 et PrrF2 sont transcrits dans des environnements pauvres en fer et inhibés lorsque le régulateur d'absorption de fer Fur est complexé au fer, permettant une utilisation du fer raisonnée par la cellule bactérienne en carence (Plaza, 2020).

III.5.4. Systèmes à deux composants et facteurs sigma

Lors d'un stress environnemental, la bactérie va capter des signaux. L'élaboration et la transduction d'un signal de réponse se transmettent jusqu'à un régulateur transcriptionnel par des systèmes à deux composants (TCS). De concert, des facteurs σ alternatifs ou des protéines régulatrices vont moduler l'expression génique afin d'ajuster la physiologie cellulaire aux contraintes environnementales.

Les TCS sont composés d'une histidine kinase (HK) souvent transmembranaire et d'un régulateur de réponse (RR). Le stimulus est reconnu par l'HK qui va alors s'autophosphoryler (par hydrolyse de l'ATP en ADP) puis transférer le groupement phosphate au RR. Le RR peut être un régulateur transcriptionnel, se fixant sur des régions promotrices des gènes pour moduler la transcription, ou il peut agir sur des cibles protéiques et moduler leur activité enzymatique.

P. aeruginosa possède plus de 60 TCS, 64HK et 72 RR, dont plus de la moitié sont impliqués dans la virulence, le fitness bactérien ou la capacité de colonisation (Jimenez et al., 2012; Francis et al., 2017).

Parmi eux, le système chémosensoriel Wsp ainsi que le système CHP/FIMS/AlgR régulent positivement la formation de biofilm, le système Roc contrôle positivement la production de *fimbriae*, et les TCS PhoQP, PmrBA, ColSR, CprSR interviennent dans les modifications structurelles du LPS et ainsi dans la virulence (Francis et al., 2017).

Le TCS le plus décrit est le système Gac/Rsm (Jimenez et al., 2012; Valentini et al., 2018). Il est composé d'une HK GacS, qui après autophosphorylation transfère son groupement phosphate au RR GacA, induisant la transcription des gènes *rsmY* et *rsmZ* codant des petits ARN. RsmY et RsmZ se lient au répresseur post-transcriptionnel RsmA. Le rôle majeur de ce TCS est la transition de l'infection aiguë à l'infection chronique. La levée de la répression par RsmA est à l'origine d'une formation de biofilm (par augmentation de la production d'exopolysaccharides) et d'une diminution de la production de certains facteurs de virulence (pyocyanine, élastase, SST3, etc.). Plusieurs kinases interagissent avec le système Gac/Rsm, notamment RetS (qui se lie à GacS et inhibe sa phosphorylation) et LadS qui, au contraire, l'induit. Le système Gac/Rsm, via RsmA, régule aussi négativement la production des AHL impliquées dans les système Las et Rhl du QS (Figure 17) (Jimenez et al., 2012; Balasubramanian et al., 2013; Francis et al., 2017; Valentini et al., 2018).



Figure 17 : Régulation de la virulence de *P. aeruginosa* par le système Gac/Rsm D'après (Jimenez et al., 2012)

Bien que les TCS soient généralement considérés comme fonctionnant seuls, de récentes études suggèrent l'implication de multikinases dans la régulation de la virulence de *P. aeruginosa.* Les système de multikinases comprennent plusieurs HK capables de détecter et d'intégrer de multiples stimuli (Francis et al., 2017).

Les facteurs sigma sont impliqués dans la régulation de l'expression génique et la réponse au stress. Les facteurs σ en conditions physiologiques sont séquestrés par leur facteur anti- σ . La réponse à un stress environnemental va résulter en un changement conformationnel, à l'origine de la libération du facteur σ , qui pourra agir sur la transcription de gènes.

Parmi les facteurs σ figure RpoS, qui se lie à des régions promotrices des systèmes de QS, affectant notamment l'expression de *lasR* et *rhlR* (Balasubramanian et al., 2013). Un autre facteur σ , AlgU, une fois libéré par son facteur anti- σ MucA, régule positivement la production d'alginate, à l'origine du morphotype mucoïde des colonies (Jones et al., 2010; Malhotra et al., 2018).

III.5.5. CRISPR

Pour échapper aux infections virales, les bactéries mettent en place plusieurs mécanismes permettant de lyser l'ADN étranger. Le système CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas (*CRISPR associated proteins*) constitue la seule immunité adaptative de *P. aeruginosa* face aux invasions virales (Høyland-Kroghsbo et al., 2017).

En conclusion, la **Figure 18** illustre les principales interconnexions des systèmes régulateurs de la virulence et de la transition entre infection aiguë et infection chronique chez *P. aeruginosa*.



infection chronique chez P. aeruginosa

D'après (Moradali et al., 2017)

IV. Diversité génétique et adaptation à l'hôte

P. aeruginosa est fréquemment identifié au sein de l'environnement hospitalier et représente l'une des principales espèces responsables d'IAS, dont l'origine peut être aussi bien environnementale qu'humaine (Parkins et al., 2018).

P. aeruginosa possède une écologie complexe ; aucune corrélation stricte n'a été mise en évidence entre un génotype et un environnement donné. Aussi, différencier les isolats cliniques des isolats environnementaux demeure complexe et des méthodes de typage moléculaire de plus en plus puissantes sont nécessaires (Magalhães et al., 2020).

Le typage moléculaire permet en effet de réaliser des études de micro-épidémiologies, appliquées à un niveau local, qui permettent la comparaison moléculaire de souches afin d'identifier des possibles sources de contamination environnementales ou des transmissions croisées lors d'épidémie. L'épidémiologie moléculaire est ainsi devenue un outil essentiel de prévention des IAS. A plus large échelle, une surveillance macro-épidémiologique permet l'indentification de clones émergents au niveau mondial, mais aussi de décrire la structure de population d'une espèce bactérienne, afin de différencier des espèces clonales (évoluant principalement par mutations) et non clonales (évoluant principalement par recombinaisons) (Hallin et al., 2012).

IV.1. Méthodes d'études

Plusieurs techniques de typage (électrophorèse en champ pulsé, rep-PCR, *multiple locus variable-number tandem repeat analysis*, etc.) ont été mises au point chez *P. aeruginosa*. Le typage par *multilocus sequence typing* (MLST), méthode de typage la plus utilisée (Oliver et al., 2015), congruente avec des nombreuses méthodes précédemment citées, et le séquençage de génomes complets (*whole genome sequencing*, WGS), qui complète avantageusement cette dernière, seront détaillés plus particulièrement ci-après.

IV.1.1. Typage moléculaire par multilocus sequence typing

Le typage par MLST permet d'étudier la diversité génétique et l'évolution génotypique des bactéries sur le long terme. Cette méthode permet ainsi d'explorer l'épidémiologie globale et la phylogénie des populations.

Son principe repose sur le séquençage d'un fragment interne de sept gènes domestiques. L'analyse des polymorphismes retrouvés au sein de chacun des sept *loci* génère un profil allélique à sept chiffres définissant un *Sequence Type* (ST) (**Figure 19**) (Curran et al., 2004).



aeruginosa

(Schéma adapté de : http://beta.mlst.net/Instructions/default.html)

Le schéma de génotypage de *P. aeruginosa* par MLST a été décrit par Curran et *al.* (Curran et al., 2004) et déposé sur le site PubMLST de l'Université d'Oxford (<u>http://www.pubmlst.org</u>). Cette base de données en ligne est mise à jour à la découverte d'un nouvel allèle ou ST et comptabilise à ce jour 3464 STs (26/09/2020), illustrant la grande diversité de l'espèce.

Ce schéma a permis de mettre en évidence une structure de population non-clonale, évoluant principalement par recombinaison, et n'a pas permis d'identifier de clusters spécifiques de souches cliniques ou environnementales (Curran et al., 2004).

Le typage par MLST présente deux avantages majeurs par rapport aux techniques électrophorétiques : un caractère hautement reproductible et une transférabilité des données entre les laboratoires. Les allèles et les STs sont disponibles sur des bases de données accessibles en ligne (Chen et al., 2018). Cette technique a ainsi pris une place importante, notamment au cours d'investigations macro-épidémiologiques afin d'évaluer la diffusion des clones. Cependant, cette technique reste longue et coûteuse et nécessite un personnel formé (Sullivan et al., 2005). De plus, le pouvoir de discrimination de cette méthode est parfois insuffisant pour différencier des souches lors de la surveillance des épidémies (Chen et al., 2018). Ainsi, particulièrement au cours d'études micro-épidémiologiques où les souches sont phylogénétiquement proches, le typage par MLST nécessite parfois d'être corrélé à d'autres méthodes d'analyses plus discriminantes (Sullivan et al., 2005).

IV.1.2. Séquençage de génome complet

Le WGS est une méthode d'analyse moléculaire ultime pour les bactéries (Chen et al., 2018). La haute résolution du WGS en fait un outil puissant dans l'étude des isolats bactériens, mettant en évidence aussi bien des similarités entre les isolats que les évolutions du génome complet au cours du temps par adaptation génétique (Chen et al., 2018). Les techniques Illumina[®] et le séquençage *Pacific Biosciences* (PacBio) sont les deux techniques de référence les plus utilisées en microbiologie (Kwong et al., 2015).

Le séquençage consiste en plusieurs étapes successives (**Figure 20**) : une extraction d'ADN génomique [1], le séquençage de génome complet proprement dit [2] (pouvant produire des *reads* courts [Illumina] ou longs [PacBio]), l'alignement et le *mapping* des *reads* sur un génome de référence [3] à l'origine de l'identification de *single nucleotide polymorphism* (SNP), en parallèle de l'assemblage *de novo* en séquences contiguës appelées *contigs* [4] puis l'analyse des données en vue de réaliser une comparaison génomique [5] (Kwong et al., 2015).



Figure 20 : Etapes du séquençage de génome complet

(1) Extraction de l'ADN (2) Séquençage des génomes complets (3) Mapping des génomes à un génome de référence et analyse des SNPs (4) Assemblage *de novo* (5) Analyse des données génomiques. D'après (Kwong et al., 2015)

Le séquençage Illumina[®] permet le séquençage de génomes microbiens à faible coût. Cependant, les *reads* courts (pouvant atteindre jusqu'à 600 pb) produits par cette technologie rendent difficile l'assemblage *de novo*. Le séquençage PacBio produit, quant à lui, des *reads* longs (souvent de plus de 10kb) facilitant l'assemblage *de novo* et pouvant permettre l'obtention d'un génome circularisé. Plus efficace sur les régions riches en GC ou comportant des méthylations de l'ADN (Kwong et al., 2015), son taux d'erreur est en revanche plus élevé (pouvant atteindre 15% lorsque la profondeur de séquençage est faible) (Amarasinghe et al., 2020).

Plusieurs études récentes ont montré que l'analyse des SNPs dans les génomes bactériens permet de déterminer les relations entre les isolats épidémiologiquement proches et de suivre l'évolution bactérienne sur des périodes allant de plusieurs mois à plusieurs décennies (Markussen et al., 2014; Chen et al., 2018; Muthukumarasamy et al., 2020). Par ailleurs, un schéma de *core-genome* MLST (cgMLST) de *P. aeruginosa*, ciblant 2653 gènes, a été proposé par de Sales et *al.*, congruent avec l'analyse *core-genome* SNP (cgSNP). Il pourrait constituer un outil efficace de surveillance épidémiologique (de Sales et al., 2020) (**Figure 21**).



Figure 21 : Congruence des arbres phylogénétiques de 128 isolats de ST235 de *P. aeruginosa* par cgMLST (A) et cgSNP (B)

Les branches noires et oranges représentent les groupes 1 et 2, respectivement, précédemment décrits par (Treepong et al., 2017). Les 62 isolats de cette étude sont surlignés en vert. D'après (de Sales et al., 2020)

Le WGS est ainsi utilisé pour analyser la diversité génomique des microorganismes ou les mécanismes d'adaptation à un environnement. Des études portant sur l'évolution interclonale (permettant d'identifier des éléments génétiques corrélés à certains phénotypes ou certaines niches écologiques) ou sur l'évolution intraclonale (afin d'identifier des mécanismes de sélection qui régissent l'adaptation génétique dans des contextes spécifiques) ont ainsi pu émerger. L'analyse au niveau nucléotidique a également permis d'identifier les microévolutions au cours d'études longitudinales (Marvig et al., 2015a).

Le WGS présente néanmoins certaines limites. La majorité des études reposent sur l'analyse de SNPs, dépendantes de la qualité du séquençage et de l'assemblage à la fois de l'isolat analysé et de la souche de référence choisie. De plus, ces technologies sont coûteuses en ressources informatiques et en temps d'analyse, nécessitant une expertise technique pour analyser et interpréter les données, rendant ces technologies encore difficilement conciliables avec la routine d'un laboratoire de microbiologie clinique. Le développement et la standardisation de *pipelines* de WGS pourraient faciliter son utilisation en routine par les laboratoires (Kwong et al., 2015; Chen et al., 2018).

IV.2. Epidémiologie moléculaire des infections à P. aeruginosa

IV.2.1. Données générales

Le typage par MLST a permis de décrire la structure de population épidémique « panmictique » de *P. aeruginosa* et sa forte capacité de recombinaison (Magalhães et al., 2020). Ainsi, des souches possédant des caractéristiques génétiques uniques ont pu émerger.

Chez P. aeruginosa, une grande diversité génétique a été identifiée en lien avec une proportion importante de STs uniques appelés singletons (Horcajada et al., 2019). Ces isolats de STs singletons sont majoritairement associés à des phénotypes non-MDR (Gomila et al., 2013; Horcajada et al., 2019). Parallèlement, l'émergence et la dissémination d'isolats multirésistants, caractérisés clones épidémiques à haut risque, ont été identifiées par MLST. C'est le cas notamment de la souche « Liverpool Epidemic Strain » (LES, ST146) (Cheng et al., 1996; Williams et al., 2015) ou encore du clone C (ST17), identifiés au cours d'infections chroniques chez des patients atteints de CF (Römling et al., 2005; Oliver et al., 2015). Les clones épidémiques à haut risque les plus fréquents de P. aeruginosa appartiennent aux ST111, ST175, ST235 ainsi qu'aux ST233, ST253, ST292 et ST1725 (Oliveira et al., 2020). Ces clones possèdent à ce jour une diffusion mondiale (García-Castillo et al., 2011; Mulet et al., 2013; Del Barrio-Tofiño et al., 2017; Treepong et al., 2017). Ainsi, la diversité génétique des isolats MDR ou XDR est faible comparativement à celle des isolats non-MDR, et ce particulièrement pour les isolats XDR. En effet, 90% des isolats XDR appartiennent à seulement trois clones (ST175, ST111 et ST235) (Klockgether and Tümmler, 2017; Horcajada et al., 2019) (Figure 22).



Figure 22 : Distribution mondiale (A) et européenne (B) des souches de *P. aeruginosa* de ST235, ST111 et ST175

D'après (Horcajada et al., 2019)

Ces clones jouent un rôle important dans la dissémination de gènes de résistance (tels que des gènes codant des β -lactamases) ou celle de plasmides comportant des gènes codant des carbapénémases (Hong et al., 2015; Hagemann et al., 2018).

Ces clones épidémiques à haut risque sont également décrits en France. En effet, 30,9% des souches de *P. aeruginosa* envoyées pour expertise au CNR de Besançon en 2018 appartenaient au ST235, 11,2% au ST175 et 11% au ST111 (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, 2018).

L'essor du WGS a permis par la suite d'affiner l'épidémiologie moléculaire de *P. aeruginosa*.

L'analyse récente de 739 isolats collectés depuis diverses sources (cliniques et environnementales) a mis en évidence deux groupes phylogénétiques majeurs (nommés groupes A et B), ainsi que deux groupes mineurs (nommés C1 et C2). Les souches de laboratoire PAO1 et PA14 appartiennent aux groupes A et B, et la souche clinique PA7 au groupe C2 (Ozer et al., 2019) (Figure 23).





P. aeruginosa

L'arbre phylogénétique est basé sur l'analyse des *single nucleotide polymorphisms* du *core-genome* de 739 isolats cliniques et environnementaux. Le groupe A est indiqué en orange, le groupe B en bleu et le groupe C (qui se divise en groupes C1 et C2) en violet. La barre d'échelle représente la distance phylogénétique. Adapté de (Ozer et al., 2019)

Cette étude a mis en évidence que les deux groupes majeurs, qui divergent l'un de l'autre en termes de mutations et de recombinaisons, pouvaient être distingués par la présence de certains gènes, notamment ceux codant des protéines du T3SS, à savoir exoS (identifié chez 99,4% des isolats du groupe A) et *exoU* (identifié chez 95,2% des isolats du groupe B) (Ozer et al., 2019). De plus, une barrière génétique anti-recombinaisons ou des niches écologiques distinctes pourraient expliquer la divergence phylogénétique entre ces deux groupes majeurs. En effet, bien que des isolats cliniques et environnementaux aient été identifiés au sein des deux groupes, les isolats environnementaux et responsables d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose étaient significativement plus retrouvés au sein du groupe A (Ozer et al., 2019). De plus, les isolats n'avaient pas tous le même impact clinique. Les isolats de ST111 et ST175 exprimaient l'effecteur ExoS du T3SS, et présentaient une virulence plus faible que les isolats de ST235 (Tableau VII). A l'inverse, les isolats de ST235 exprimaient ExoU ; les patients infectés par ces isolats présentaient un moins bon pronostic et une mortalité supérieure (Peña et al., 2015; Gómez-Zorrilla et al., 2016; Horcajada et al., 2019). Par ailleurs, les clones épidémiques à haut risque présentaient généralement un taux accru de mutations spontanées et une plus forte capacité à former du biofilm (Horcajada et al., 2019).

Tableau VII : Caractéristiques des trois principaux clones épidémiques de P. aeruginosa

^a La virulence repose sur la capacité des souches à produire des infections aiguës dans divers modèles d'infections *in vivo*. D'après (Horcajada et al., 2019)

Characteristic	ST111	ST175	ST235
O-antigen serotype	012	04	011
Type III secretion system	ExoS	ExoS	ExoU
Virulence ^a	++	+	+++
Worldwide distribution	++	+	+++
Transferable resistance	++	+	+++
Mutational resistance	++	+++	++

Par ailleurs, le WGS a été utilisé pour caractériser des isolats de *P. aeruginosa* résistants aux antibiotiques (Valot et al., 2014; Cabot et al., 2016a; Dotson et al., 2016; Li et al., 2016; Del Barrio-Tofiño et al., 2017; Fraile-Ribot et al., 2017), notamment pour décrire la dissémination de clones épidémiques à haut risque (López-Causapé et al., 2017; Sherrard et al., 2017; Botelho et al., 2018; Wee et al., 2018). Il a ainsi été montré que la persistance et la dissémination de ces clones étaient associées à l'acquisition de mutations non-silencieuses au sein de gènes de résistance aux antibiotiques (Sherrard et al., 2017; Horcajada et al., 2019). Des mutations au sein des gènes *oprD*, *gyrA* et *parC* ont identifiées chez les isolats de ST111, ST175 et ST2235. Chez les isolats de ST175, des mutations supplémentaires au sein des gènes *ampR*, *gyrA* et *mexZ* étaient observées (Horcajada et al., 2019).

La dissémination de ces clones peut être liée à l'acquisition d'intégrons ou d'îlots génomiques (Botelho et al., 2018), à l'émergence d'isolats hypermutateurs (Cabot et al., 2016b; López-Causapé et al., 2017) ou encore l'acquisition de mutations au sein de gènes codant des facteurs de virulence (Wee et al., 2018). Le phénotype de résistance n'était pas entièrement expliqué par des mutations au sein de gènes de résistance ; des études complémentaires sont nécessaires pour investiguer ce phénomène (Sherrard et al., 2017; Bianconi et al., 2018).

IV.2.2. Epidémiologie moléculaire des IU

Peu d'études ont porté sur la diversité génétique des souches de *P. aeruginosa* isolées des urines. Celles-ci n'ont exploré que la présence de gènes codant les principaux facteurs de virulence par des méthodes de PCR (Tielen et al., 2011; Sabharwal et al., 2014) ou se sont focalisées sur des isolats résistants aux carbapénèmes (Pobiega et al., 2015; Osawa et al., 2019).

C'est le cas de l'étude réalisée par Gomila et al. (Gomila et al., 2013), qui a étudié la structure de population d'isolats de P. aeruginosa prélevés au sein d'un centre hospitalier espagnol. Sur les 56 isolats de l'étude, collectés chez 42 patients, 19 étaient d'origine urinaire. Ces 19 isolats, de différents profils de sensibilité aux antibiotiques, étaient assignés à 14 STs par MLST. Cette étude a mis en évidence que certains STs étaient principalement identifiés chez des souches de phénotype sauvage (ST316, ST508 etc.) alors que d'autres étaient identifiés chez des souches multirésistantes aux antibiotiques, acquises en milieu hospitalier (ST175, ST235, ST499, ST1139 et ST1188). Les isolats MDR et XDR présentaient des STs prévalents au niveau international (ST175, ST235 et ST253) (Oliver et al., 2015), alors que les souches non-MDR correspondaient principalement à des STs uniques. Cependant, une coexistence entre les isolats non résistants et résistants était observée au sein d'un même ST. L'étude menée par Pobiega (Pobiega et al., 2015) a génotypé par MLST 8 isolats urinaires (issus d'ECBU mono- ou poly-microbiens) de P. aeruginosa résistants aux carbapénèmes, de phénotype XDR, chez des patients polonais, hospitalisés ou non. Quatre isolats étaient de ST235, deux isolats de ST260, et deux isolats respectivement de ST654 et de ST234. De façon similaire, sur 21 isolats urinaires résistants aux carbapénèmes, Osawa et al. (Osawa et al., 2019) identifièrent 14 isolats de ST235.

Ainsi, l'épidémiologie des souches urinaires de *P. aeruginosa* est encore mal connue, à la différence de l'épidémiologie globale ou de celle des infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Néanmoins, le clone ST235 de diffusion mondiale identifié au cours d'IU, n'est pas spécifique d'une niche écologique donnée.

Similairement, peu d'études de WGS explorent à ce jour la diversité génomique des isolats urinaires de *P. aeruginosa*. Les rares études sont liées à la publication de « *Draft genomes »*.

Ces études ont mis en évidence la présence de gènes codant un système de sécrétion de type IV impliqué dans les transferts de gènes (Wibberg et al., 2014, 2015). Des transferts

horizontaux de gènes avec d'autres espèces (telles que *Vibrio cholerae* ou *Bordetella pertussis*) ainsi que l'acquisition de transposons ou de phages ont également été identifiés. Enfin, des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques (*ampR*) et aux métaux lourds (*merA*), la protection contre le stress osmotique et l'acquisition du fer (gène codant un récepteur de la pyochéline) ont été identifiés au sein de ces isolats (Tielen et al., 2014; Wibberg et al., 2014; Vorhölter et al., 2015; Wibberg et al., 2015).

IV.3. Etudes longitudinales, évolution au cours du temps

Le WGS a également été appliqué à l'étude de l'adaptation de *P. aeruginosa* chez l'hôte au cours d'infections chroniques. Aucune étude n'a caractérisé à ce jour l'adaptation et la persistance de cette espèce au cours du temps au sein du tractus urinaire. Les données bibliographiques présentées ci-après sont celles publiées à partir des principales données disponibles portant sur les infections respiratoires chroniques à *P. aeruginosa*, notamment chez des patients atteints de CF.

L'évolution génomique peut être liée à des mutations *de novo* au sein du génome bactérien ou à une acquisition d'ADN étranger (plasmides, intégrons, séquences d'insertion, etc.) depuis un autre microorganisme. Les mutations *de novo* incluent les SNPs, les insertions, les délétions ou les réarrangements génomiques (duplications, inversions, translocations) (Marvig et al., 2015a).

IV.3.1. Evolution par mutations

De nombreuses études se sont intéressées aux SNPs, identifiés comme une source majeure de variation génétique au cours du temps (Marvig et al., 2015a).

IV.3.1.1. Evolution en sous-populations

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'infection débute généralement par une souche unique acquise depuis l'environnement proche des patients (Tai et al., 2015; Parkins et al., 2018), mais l'hétérogénéité du milieu permet la présence de multiples niches distinctes au sein des poumons des patients atteints de CF. Une population bactérienne peut ainsi se

diversifier en sous-populations, chacune adaptée génétiquement aux pressions de sélection des niches respectives (Chung et al., 2012; Feliziani et al., 2014) (Figure 24).





aux différentes niches pulmonaires et ainsi la coexistence de sous-populations. D'après (Didelot et al., 2016)

IV.3.1.2. Evolution convergente

La phylogénie basée sur les SNPs a permis de distinguer des souches génétiquement proches au cours du temps et a mis en évidence, au cours d'infections respiratoires chroniques à *P. aeruginosa*, une coexistence de multiples lignées chez un patient (Caballero et al., 2015; Marvig et al., 2015b; Williams et al., 2015; Bianconi et al., 2018). En effet, une souche ancestrale peut diverger rapidement après l'infection en sous-lignées stables dans le temps, chacune ayant son identité fonctionnelle et génomique (Markussen et al., 2014). Cette adaptation par mutations se met en place rapidement chez *P. aeruginosa*, particulièrement lors des premiers stades de l'infection chronique (durant 2-3 ans) (Bartell et al., 2019). Pour différencier des souches génétiquement distants de plus de 6000 SNPs (Marvig et al., 2015b).

De plus, des souches distinctes semblent évoluer de façon similaire chez différents patients au cours d'une infection donnée, probablement en lien avec les conditions hostiles du milieu. Ainsi, des gènes « pathoadaptatifs » sont soumis chez des souches distinctes aux mêmes pressions, à l'origine de la notion « d'évolution convergente » (Marvig et al., 2015b).

Ces gènes pathoadaptatifs varient selon les études (24 à 52) (Huse et al., 2010; Marvig et al., 2015b) et sont majoritairement impliqués dans la résistance aux antibiotiques, la régulation du métabolisme, la virulence et la composition de l'enveloppe cellulaire (**Tableau VIII**) (Caballero et al., 2015; Marvig et al., 2015a; Bianconi et al., 2018).

Tableau VIII : Gènes pathoadaptatifs identifiés chez P. aeruginosa au cours d'études					
longitudinales chez des patients atteints de mucoviscidose					
D'après (Marvig et al., 2015a)					
Locus tag	Gene name	Product/function			
PA5015	aceE	Pyruvate dehydrogenase			
PA0762	algU	Stress sigma factor regulating alginate production			
PA4110	ampC	β-lactamase precursor			
PA4418	ftsl	Penicillin-binding protein			
PA4266	fusA1	Elongation factor G			
PA3168	gyrA	DNA gyrase subunit A			
PA0004	gyrB	DNA gyrase subunit B			
PA1430	lasR	Transcriptional regulator			
PA0425	mexA	Multidrug efflux membrane fusion protein precursor			
PA0426	mexB	Multidrug efflux transporter			
PA2491	mexS	Oxidoreductase involved in regulation of multidrug efflux pump			
PA2018	mexY	Multidrug efflux transporter			
PA2020	mexZ	Transcriptional regulator of multidrug efflux pump			
PA3574	nalD	Transcriptional repressor of multidrug efflux pump			
PA0958	oprD	Outer membrane porin			
PA0861	rbdA	Protein with c-di-GMP cyclase and phosphodiesterase domain			
PA3271	-	Sensor of two-component regulatory system			
PA3064	pelA	Polysaccharide deacetylase			
PA0313	vecS	L-cysteine transporter of ABC system			

IV.3.1.3. Evolution par acquisition de résistance aux antibiotiques

Chez les patients atteints de CF infectés par *P. aeruginosa*, l'évolution est étroitement liée aux cures d'antibiothérapie (Tai et al., 2015; Parkins et al., 2018) qui favorisent la sélection de souches résistantes aux antibiotiques. Ainsi, plusieurs études se sont intéressées au résistome de *P. aeruginosa* (López-Causapé et al., 2017; Wardell et al., 2019), dont les principaux gènes sont listés dans le **Tableau IX** (Horcajada et al., 2019).

Tableau IX : Principaux gènes impliqués dans la résistance mutationnelle de P. aeruginosa

Gene(s)	Resistance mechanism	Antibiotics affected
gyrA	Quinolone target modification (DNA gyrase)	Fluoroquinolones
gyrB	Quinolone target modification (DNA gyrase)	Fluoroquinolones
parC	Quinolone target modification (DNA topoisomerase IV)	Fluoroquinolones
parE	Quinolone target modification (DNA topoisomerase IV)	Fluoroguinolones
pmrA, pmrB, phoQ, cprS,	Lipopolysaccharide modification (addition of the	Polymyxins
coIR, coIS	4-amino-4-deoxy-L-arabinose moiety	
	to the lipid A portion)	
parR	Lipopolysaccharide modification (addition of the	Polymyxins
	4-amino-4-deoxy-L-arabinose moiety to the lipid A portion)	
	OprD downregulation	Imipenem meropenem
	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones, aminoglycosides, cefepime
parS	Lipopolysaccharide modification (addition of the	Polymyxins
	to the linid A portion)	
	OprD dowpregulation	Iminenem meropenem
	MexEE-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones aminoglycosides cefenime
	Mext hyperproduction	nuoroquinoiones, anninogrycosides, cereprine
mexR, nalC, nalD	MexAB-OprM hyperproduction	Fluoroquinolones, ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam, meropenem, ceftazidime-avibactam
nfxB	MexCD-OprJ hyperproduction	Fluoroquinolones, cefepime
mexS	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
mexT	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
	OprD downregulation	Imipenem, meropenem
cmrA, mvaT, PA3271	MexEF-OprN hyperproduction	Fluoroquinolones
mexZ, PA5471.1, amgS	MexXY hyperproduction	Fluoroquinolones, aminoglycosides, cefepime
oprD	OprD porin inactivation	Imipenem, meropenem
ampC	AmpC structural modification	Ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam
ampD, ampDh2, ampDh3, ampR, dacB, mpI	AmpC hyperproduction	Ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam
ftsl	β -Lactam target modification (PBP3)	Ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam, ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam, meronenem
fusA1	Aminoglycoside target modification (elongation factor G)	Aminoalycosides
alpT	Inactivation of transporter protein GInT	Fosfomycin
moB	Rifampin target modification, RNA polymerase <i>B</i> -chain	Rifampin

D'après (Horcajada et al., 2019)

Le résistome des β -lactamines est caractérisé par des mutations au sein de nombreux gènes. Certaines de ces mutations (au sein des gènes *ampC*, *ampD*, *ampR*, ou *dacB*) peuvent conduire à la surproduction d'AmpC (López-Causapé et al., 2018). L'altération de la porine OprD, peut être causée par des mutations, insertions ou délétions de nucléotides au sein du gène *oprD*, ainsi qu'au sein des gènes codant le TCS ParRS (López-Causapé et al., 2018; Pang et al., 2019). Enfin, la sélection par antibiotiques d'isolats présentant de larges délétions génomiques (> 200 kb), et plus particulièrement du gène *galU* codant une UDP-glucose pyrophosphorylase impliquée dans la synthèse du lipopolysaccharide (LPS), peut constituer un mécanisme de résistance des isolats vis-à-vis de la ceftazidime, du méropénème et des aminosides (Cabot et al., 2016); López-Causapé et al., 2018; Wardell et al., 2019).

Plusieurs *loci*, tels que *mexR*, *nalD*, *nalB* ou *nalC*, régulent négativement l'expression des gènes de l'opéron *mexAB-oprM*. Des mutations au sein de ces *loci*, à l'origine d'une perte de fonction de ces gènes est à l'origine de la surproduction de ce système d'efflux (Lopez-Causapé 2018). L'opéron *mexXY* est majoritairement sous le contrôle d'un gène répresseur *mexZ*, bien que d'autres gènes (tels que le TCS *parRS*) puissent réguler l'expression des gènes impliqués dans cet efflux. Des mutations au sein de ces gènes sont ainsi à l'origine de la surproduction de MexXY-OprM et de la résistance aux aminosides (Poole, 2005, 2011; Pang et al., 2019).

Les mutations les plus fréquentes impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones concernent le gène *gyrA* codant l'ADN gyrase. Des mutations du gène *parC* codant la topoisomérase IV peuvent survenir secondairement chez des mutants GyrA, induisant un plus haut niveau de résistance de la souche aux fluoroquinolones (López-Causapé et al., 2018). Bien que des mutations aient été décrites dans les gènes *gyrB* et *parE* (Lee et al., 2005; Lister et al., 2009), la fréquence de ces mutations est faible, et celles-ci n'ont qu'un rôle mineur dans la résistance aux fluoroquinolones.

En parallèle, des souches dites hypermutatrices présentent des mutations au sein des gènes codant les systèmes de réparation de l'ADN [*mutS* et *mutL*], la synthèse de nucléotides [*mutM* et *mutY*] ou encore des protéines impliquées dans les phénomènes de réparation ou de recombinaison de l'ADN [tels que *recB* ou *uvrA*] (Qin et al., 2018). En raison d'un défaut de réparation de l'ADN, les mutations sont fréquentes ; 50 à 106 SNPs par an selon les populations (Cramer et al., 2011; Feliziani et al., 2014) contre 1-3 pour les souches non-hypermutatrices (Snyder et al., 2013; Markussen et al., 2014; Marvig et al., 2015a). Les mutations peuvent survenir au sein de gènes de résistance précédemment cités, à l'origine de résistance aux antibiotiques. L'apparition de souches hypermutatrices représente un marqueur d'infections chroniques chez les patients atteints de CF (Colque et al., 2020). En effet, 22 à 54% des patients atteints de CF infectés de façon chronique par *P. aeruginosa* présentent des souches hypermutatrices (Marvig et al., 2020). Les souches non- et hypermutatrices peuvent coexister chez un patient, probablement au sein de niches pulmonaires distinctes (Marvig et al., 2013).

IV.3.1.4. Adaptation de la virulence

Parallèlement à l'acquisition de résistance, des mutations au sein de gènes de virulence peuvent favoriser la persistance de *P. aeruginosa* au cours d'infections chroniques (Marvig et al., 2015a).

La perte de motilité de type *swimming* a été identifiée chez *P. aeruginosa* parmi les premières étapes d'adaptation chez l'hôte au cours d'infections chroniques (Sousa et al., 2018). En effet, les poumons des patients atteints de CF sont décrits pour favoriser l'implantation de mutants des gènes codant le flagelle, facteur très immunogène (Harrison et al., 2020).

De plus, des mutations, principalement situées au sein des gènes de l'opéron *wsp*, à l'origine d'une élévation du taux de c-di-GMP, sont associées à l'apparition du morphotype agrégatif RSCV et à la formation de biofilm (Harrison et al., 2020). De plus, le c-di-GMP régule négativement la formation du flagelle (facteur immunogène à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire) et participe ainsi à l'évasion de la réponse immunitaire (Malhotra et al., 2019).

Pour échapper au système immunitaire de l'hôte, des modifications structurales du LPS ont également été décrites (Riquelme et al., 2020). Constitué d'un lipide A, d'un noyau saccharidique intermédiaire (appelé *core*) lié ou non à une chaine polysaccharidique (appelée antigène somatique O), le LPS est une endotoxine située dans la membrane externe qui interagit avec les tissus hôtes (Huszczynski et al., 2019). Il constitue de ce fait un composé immunogène, dont la virulence est corrélée à la présence et la longueur de son antigène O. Des modifications structurelles au niveau du lipide A (par mutation au sein des gènes *pagL, lpxO2* à l'origine d'une baisse de l'activité pro-inflammatoire) ou des mutations responsables de la perte de l'antigène O (par mutations au sein des gènes *wbpA* ou *wbpZ* impliqués dans la biosynthèse du LPS) sont fréquemment décrites lors d'infections chroniques chez les patients atteints de CF (Maldonado et al., 2016). Ces modifications structurelles réduisent le potentiel immunostimulateur du LPS et contribuent à l'évasion du système immunitaire de l'hôte et à la survie de *P. aeruginosa* au cours d'infections chroniques *in vivo* (Maldonado et al., 2016).

IV.3.1.5. Adaptation du métabolisme

La forte capacité d'adaptation métabolique de *P. aeruginosa* représente l'un des facteurs majeurs de sa survie chez l'hôte (Riquelme et al., 2020). Cette plasticité métabolique lui permet d'utiliser au mieux les différentes sources nutritives, notamment les différentes sources de carbone (Dolan et al., 2020).

Au cours d'infections chroniques, *P. aeruginosa* utilise principalement les acides aminés ou d'autres acides organiques (tels que le citrate et le lactate) pour son métabolisme central, grâce au cycle de l'acide tricarboxylique (cycle TCA) (**Figure 25**) (La Rosa et al., 2019).



Figure 25: Réorganisation métabolique de *P. aeruginosa* au cours d'infections pulmonaires chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose

(A) La figure représente les différents types d'assimilation des métaboliques des souches adaptées et des souches naïves : l'assimilation sélective (succinate, glucose, valine et ornithine) ; l'assimilation indispensable en raison de l'auxotrophie (arginine, leucine et méthionine) ; l'assimilation conservée (asparagine, glycérol, sérine, alloisoleucine et leucine) ; l'assimilation altérée (aspartate, acétate, glutamate, lactate et pyruvate) ; la sécrétion sélective (acétate, ornithine, pyruvate, lactate et glycine) ; l'assimilation réduite (oxygène).
(B) Programme métabolique *in vivo* de *P. aeruginosa*. Les gènes régulés *in vivo* par rapport à ceux

in vitro sont représentés en rouge. Les gènes régulés négativement sont indiqués en bleu, et les gènes dont l'expression est constante dans les deux conditions (*in vivo* et *in vitro*) sont en gris. Les composés assimilés pendant la phase exponentielle par les souches cliniques adaptées de *P. aeruginosa* sont indiquées en vert. Les lignes pointillées relient les composés impliqués dans les voies métaboliques. D'après (La Rosa et al., 2019)

Une hétérogénéité dans les profils métaboliques est observée aux stades précoces de l'infection respiratoire chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, puis diminue au cours de l'infection (La Rosa et al., 2019). La réduction des fonctions métaboliques, causées par des mutations s'accumulant au cours du temps, pourrait représenter un avantage sélectif pour l'adaptation aux poumons des patients atteints de CF (La Rosa et al., 2019).

Par ailleurs, d'autres gènes, notamment ceux impliqués dans le métabolisme, peuvent participer à la virulence des isolats. En effet, Panayidou et *al.* (Panayidou et al., 2020) ont montré que 16.5% des *core genes* du métabolisme étaient nécessaires à la virulence des isolats (Panayidou et al., 2020). Des mutants délétés des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (*hisc1, hisD, hisX, gtdA, hom*), du métabolisme nucléotidique (*surE, purD, purN*) ou du métabolisme des vitamines (*metF, epd, folK*) n'étaient pas virulents dans des modèles d'infections *in vivo* (Panayidou et al., 2020).

IV.3.1.6. Régions intergéniques

Bien que les SNPs puissent toucher indépendamment des régions codantes ou intergéniques, de nombreuses analyses se focalisent sur les régions codantes. Ainsi, le rôle des régions intergéniques est mal investigué à ce jour. Khademi et *al.* (Khademi et al., 2019) ont identifiés 77 régions intergéniques cibles de l'évolution de 44 lignées cliniques de *P. aeruginosa*. Les mutations intergéniques ciblaient fréquemment des séquences impliquées dans mécanismes transcriptionnels et pouvaient altérer l'expression de gènes impliqués dans les interactions hôte-pathogène, le métabolisme cellulaire ou la résistance aux antibiotiques (Khademi et al., 2019).
IV.3.2. Evolution par insertions ou délétions

Parallèlement à l'évolution par SNPs, des micro-insertions ou délétions (nommées microindels) peuvent survenir au sein des génomes bactériens. Le taux de microindels par SNP a été estimé à 0.16 chez *P. aeruginosa* (Marvig et al., 2013).

L'évolution peut être associée à l'acquisition dans le génome d'éléments génétiques mobiles. Les séquences d'insertions (IS) représentent les plus petits de ces éléments. Elles jouent néanmoins un rôle important dans l'évolution génomique, et contribuent à la plasticité des génomes bactériens (Adams et al., 2016; Mogro et al., 2020; Vandecraen et al., 2017). L'insertion d'IS peut contribuer à l'inactivation du gène dans lequel l'insertion a lieu, mais également à moduler l'expression des gènes avoisinants par création d'un promoteur alternatif ou d'un terminateur de séquence(Vandecraen et al., 2017). Les IS participent ainsi à l'adaptation phénotypique, notamment en termes de résistance aux antibiotiques, de virulence ou de métabolisme (Mogro et al., 2020; Vandecraen et al., 2017). A titre d'exemple, l'insertion d'une IS au sein du gène *oprD* codant une porine a été associée à l'inactivation de ce gène, à l'origine d'une résistance des isolats de *P. aeruginosa* à l'imipénème (Sun et al., 2016; Vandecraen et al., 2016; Vandecraen et al., 2016; Vandecraen et al., 2017).

Par ailleurs, de multiples copies d'IS identiques au sein d'un génome facilitent les réarrangements génomiques tels que les inversions, les duplications ou encore les délétions (Vandecraen et al., 2017).

De larges délétions génomiques ont été identifiées *in vitro* ou *in vivo* (Rodríguez-Rojas et al., 2009; Rau et al., 2012; Cabot et al., 2016b; Hocquet et al., 2016; Wardell et al., 2019); certaines d'entre elles seront décrites ci-après.

Rau et son équipe (Rau et al., 2012) ont mis en évidence, lors d'une étude rétrospective réalisée sur 45 isolats provenant de 16 patients sur une période de 35 ans, que l'adaptation génomique à l'hôte au cours de la phase précoce de l'infection était préférentiellement associée à une réduction du répertoire génomique plutôt qu'à l'acquisition de nouvelles fonctions. De larges délétions génomiques ont ainsi été identifiées, pouvant atteindre jusqu'à 8% du génome de la souche de référence, en lien avec des mécanismes de recombinaison souvent homologue (Rau et al., 2012; Cabot et al., 2016b).

Ces délétions sont souvent associées à la délétion des gènes *hmgA* et *galU*, impliqués dans la résistance au stress et aux pyocines. L'inactivation de ces gènes induit la production

de pyomélanine, pigment brun facilement identifiable lors de la culture des souches et pouvant servir de marqueur spécifique de ces délétions (Cabot et al., 2016b). Ces souches délétées sont associées à la persistance de *P. aeruginosa* au cours d'infections pulmonaires chroniques, probablement lié à l'effet protecteur de la pyomélanine face au stress cellulaire (Rodríguez-Rojas et al., 2009; Hocquet et al., 2016). Ces délétions permettent ainsi à la bactérie de survivre en condition de stress (notamment *in vitro* lors d'exposition à des doses croissantes de méropénème) (Cabot et al., 2016b) ou face à la pression de sélection des bactériophages (Le et al., 2014).

Ainsi, plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à la diversité génomique de *P. aeruginosa* (Winstanley et al., 2016). Ils concernent des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, la virulence et le métabolisme. Ces variations génomiques peuvent être à l'origine d'une diversité phénotypique (Williams et al., 2015; Winstanley et al., 2016). Une perte ou l'altération de la production de facteurs de virulence sécrétés, associés au mode de vie planctonique, est observée, favorisant la formation de biofilm et l'acquisition de résistance (Winstanley et al., 2016).

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif ubiquitaire. Pathogène opportuniste, il est fréquemment responsable d'infections urinaires. Du fait de son large arsenal de facteurs de virulence, de sa capacité à acquérir des résistances vis-à-vis de nombreux antibiotiques et de son génome très plastique, il est capable de s'adapter et de survivre à divers environnements, rendant difficile la prise en charge de ces infections.

L'épidémiologie des infections à *P. aeruginosa* est marquée par l'émergence de clones épidémiques à haut risque, multirésistants de diffusion mondiale, fréquemment isolés dans des contextes hospitaliers.

Cette espèce est fréquemment responsable d'infections respiratoires chroniques, particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces patients, des analyses génomiques réalisées sur des isolats séquentiels ont permis d'identifier des mécanismes moléculaires à l'origine de la persistance de *P. aeruginosa* au sein de l'arbre respiratoire.

A l'inverse, très peu d'études ont cherché à caractériser la diversité moléculaire des souches urinaires ou encore l'évolution au long cours de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire.

Travaux personnels

I. Introduction générale des travaux personnels

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste, fréquemment responsable d'IUAS (Venier et al., 2012; Gomila et al., 2018). Du fait de son large génome très plastique et de sa capacité à acquérir de nouvelles résistances face aux antibiotiques disponibles sur le marché (Pang et al., 2019), les infections à *P. aeruginosa* sont grevées d'une morbi-mortalité importante et peuvent être difficiles à traiter (Venier et al., 2012; Lamas Ferreiro et al., 2017; Gomila et al., 2018). Ainsi, *P. aeruginosa* appartient aux pathogènes ESKAPE (Oliveira et al., 2020) et représente à ce jour un « agent pathogène prioritaire », menaçant pour la senté humaine (World Health Organization, 2018).

Des études de typage moléculaire ont permis d'identifier lors d'études macroépidémiologiques, l'émergence de clones épidémiques à haut risque, responsables d'épidémies au niveau mondial (Oliver et al., 2015; Parkins et al., 2018; Oliveira et al., 2020). Ces souches ont été isolées dans divers contextes cliniques, tels que les infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose ou hospitalisés en services de réanimation et ou de soins intensifs, bien que la structure de population des isolats chez ces patients demeure diverse. Cependant, à ce jour l'épidémiologie moléculaire des infections urinaires demeure peu décrite (Pobiega et al., 2015; Osawa et al., 2019).

Dans ce contexte, l'objectif de ce Doctorat était double :

1- Tout d'abord étudier l'épidémiologie moléculaire d'isolats urinaires de *P. aeruginosa.* Pour ce faire, nous avons constitué de façon prospective une cohorte de 120 patients hospitalisés dans différents services du CHU de Rouen entre juin 2016 et août 2018, un tiers présentant une IU et deux tiers une BA. Faisant l'hypothèse que plusieurs souspopulations de *P. aeruginosa* pourraient coexister dans l'arbre urinaire comme ce qui est décrit au niveau de l'arbre pulmonaire (Waine et al., 2009; Didelot et al., 2016), 5 isolats par prélèvement (lorsque la bactériurie était suffisante) ont été collectés pour chaque ECBU.

Dans cette première étude nous avons cherché à caractériser non seulement la diversité génotypique (par MLST) mais aussi la diversité phénotypique (étude de la sensibilité aux antibiotiques) des isolats de *P. aeruginosa* responsables d'IU comparativement à celles des isolats associés à une BA.

2- Etudier les mécanismes d'adaptation de *P. aeruginosa* à l'arbre urinaire. Pour cela, nous avons mené, pour sept patients présentant plusieurs bactériuries positives à *P. aeruginosa* au cours du temps, des analyses génomiques (séquençage des génomes complets) et phénotypiques (étude de la formation de biofilm et du fitness en milieu urinaire artificiel).

La Figure 26 résume les étapes d'inclusion des patients, les modalités de collection des isolats et les analyses réalisées dans nos deux études.



Figure 26: Modalités de collection des isolats et analyses réalisées au cours des deux études du Doctorat

Pour ce faire, les isolats cliniques ont été collectés de manière prospective par l'équipe du laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen et moi-même. Le souchier a été constitué par mes soins au sein du laboratoire GRAM. Les données cliniques ont été collectées et analysées par moi-même puis validées par un comité d'experts composés d'infectiologues et de biologistes.

A côté de la réalisation des antibiogrammes, j'ai mis au point les protocoles des analyses phénotypiques (fitness, formation de biofilm), avec l'aide de Maxime Grand (ATER au sein du laboratoire). Les expérimentations ont été effectuées par Thomas Froidure (étudiant en Master 2) et Maxime Grand, sous ma supervision.

Les différentes étapes du typage MLST (analytiques et post-analytiques) ont été réalisées par moi-même, en dehors du séquençage lui-même qui a été sous-traité à la société GATC-Eurofins. J'ai réalisé une étape de pré-lyse pour les 101 isolats séquencés par Illumina. L'extraction de l'ADN génomique, la préparation des librairies et le séquençage proprement dit, Illumina et PacBio, ont été sous-traités par les plateformes P2M (Pasteur, Paris) et Gentyane (Inrae, Clermont-Ferrand), respectivement. Les commandes bioinformatiques ont été effectuées par l'ingénieur bioinformatique du laboratoire, et les données collectées ont été analysées par mes soins.

II. Premier travail personnel

II.1. Publication n°1

Antimicrobial resistance and phenotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* urinary isolates collected prospectively in a French hospital

<u>Cottalorda A</u>, Dahyot S, Soares A, Alexandre K, Zorgniotti I, Etienne M, Jumas-Bilak E, Pestel-Caron M.

Article en préparation pour une soumission dans la revue Journal of Clinical Microbiology.

Ce travail a fait l'objet de trois communications affichées dans des congrès internationaux (RICAI, Paris, 2017 et 2018 ; ECCMID, Madrid, 2018).

1	Antimicrobial resistance and genotypic diversity
2	of Pseudomonas aeruginosa urinary isolates
3	collected prospectively in a French hospital
4	
5 6	Agnès Cottalorda ^{a#} , Sandrine Dahyot ^b , Anaïs Soares ^b , Kevin Alexandre ^b , Isabelle Zorgniotti ^c , Manuel Etienne ^b , Estelle Jumas-Bilak ^c , Martine Pestel-Caron ^b
7	^a Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, F-76000 Rouen, France
8 9	^b Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, Rouen University Hospital, F-76000 Rouen, France
10 11	^c Team Pathogènes Hydriques Santé Environnement, UMR 5569 HydroSciences Montpellier, University of Montpellier, France
12 13 14	Running head: Diversity of <i>P. aeruginosa</i> urinary isolates
15	[#] Corresponding author:
16	E-mail: agnes.cottalorda@hotmail.fr
17	Phone number: +33 235 148 299 ; fax number : +33 235 148 203
18	Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, F-76000 Rouen, France
19	
20	
21	

22 Abstract

23

Objectives: This study aimed to assess phenotypic and molecular inter-patient and within-host diversity of *P. aeruginosa* isolates responsible for urinary tract infection (UTI) or asymptomatic bacteriuria (AB).

Methods: Clinical data of 120 consecutive *P. aeruginosa* UTI (n = 40) and AB (n = 80) were prospectively analysed. Up to five *P. aeruginosa* isolates per sample were collected. Antimicrobial susceptibility testing (AST) was determined for all isolates (n = 591); a subset of 358 was characterized by multilocus sequence typing.

31 **Results:** *P. aeruginosa* was mainly identified in patients with urinary catheter (n = 60), urological disorders (n = 61), and with previous antibiotic therapy (n = 93) or previous 32 hospitalization (n = 86). 444 isolates (75%) were non-multidrug resistant (MDR), 113 (19%) 33 MDR, and 34 (6%) extensively drug resistant. A genetically highly diverse population was 34 observed (64 sequence types [STs]), without strict correlation between genotypes and clinical 35 settings. 35 patients (28%; 12 UTIs and 23 ABs) presented distinct antimicrobial resistance 36 37 (AMR) profiles within a given urine sample; among them, five had polyclonal UTI or AB (based on MLST genotyping). 38

Conclusions: This is the first study to describe both within-host AMR and molecular
diversity, which can complicate AST and treatment of urinary infections.

41

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Urinary tract infection, Asymptomatic bacteriuria,
Antimicrobial resistance, MultiLocus sequence typing, Polyclonal bacteriuria

45 Introduction

46

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for 7-10% of 47 healthcare-associated urinary tract infections (UTIs) [dataset](1-3). P. aeruginosa UTI 48 commonly affects patients with underlying conditions, such as urinary tract abnormalities 49 [dataset](2,4), and are particularly promoted by urinary indwelling catheter [dataset](2). 50 Distinguishing UTI from asymptomatic bacteriuria (AB) is therefore difficult, particularly in 51 elderly patients [dataset](5). However, this distinction is essential as UTI overdiagnosis leads 52 53 to inappropriate prescription of antibiotics and thus to emergence of antimicrobial resistance 54 (AMR) [dataset](5).

55 Moreover, because of its intrinsic antibiotic resistance and its ability to develop new 56 ones, multidrug resistance is frequently reported in *P. aeruginosa* urinary strains 57 [dataset](4,6). This phenomenon drives to infections difficult to treat [dataset](7).

58 Multilocus sequence typing (MLST) analyses identified epidemic high-risk clones 59 resistant to antibiotics that are responsible for healthcare-associated infections [dataset](8) but 60 limited studies have explored genetic diversity of *P. aeruginosa* urinary strains 61 [dataset](9,10). They often explored limited number of strains that are resistant to antibiotics. 62 Thus, little is known about both molecular epidemiology and within-sample diversity of 63 *P. aeruginosa* urinary isolates.

In this context, the aim of this study was (i) to study antimicrobial resistance (AMR) and genetic background of *P. aeruginosa* isolates collected from UTI or AB, and (ii) to explore within-host diversity of these isolates.

67 Methods

68

Pseudomonas aeruginosa strain collection and patient characteristics

From June 2016 to August 2018, we prospectively collected isolates for all 69 monomicrobial urine cultures positive for P. aeruginosa (regardless of the level of bacteriuria 70 71 and leucocyturia) in the Rouen University Hospital. Clinical data of the patients were collected prospectively from the hospital's computerized medical and biological records. The 72 diagnosis of UTI or AB was assigned according to the diagnosis retained by the physician in 73 charge of the patient, and confirmed by a committee made up of microbiologists and 74 infectious disease physicians. A total of 120 patients were included, the first 40 with UTI and 75 the first 80 with AB. According to French regulation on observational database analyses, the 76 study did not need specific informed consent requirements; it was registered by the 77 Directorate of Clinical Research and Innovation under number 2018/413/OB. 78

For each urine culture, two (in case of low-level bacteriuria) to five single colonies representative of all morphotypes observed were selected, as described by [dataset](11,12). Bacterial isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and stored at -80°C for further studies.

84

85 Antibiotic susceptibility

Antibiotic susceptibility testing (AST) was performed for the 591 isolates collected by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France) according to the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (https://www.eucast.org/). Disks were purchased from Bio-Rad®. The *P. aeruginosa* strain ATCC 27853 was used as quality control strain in each experiment. A relative standard deviation of the inhibition zone diameter between intra-sample isolates was calculated for the 15 antibiotics tested.

Consensus recommendations [dataset](13) were used to evaluate the proportion of MDR (not susceptible to at least three antimicrobial groups) and XDR (not susceptible to the six antimicrobial groups tested) isolates, considering the following antimicrobial groups: penicillin (ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, piperacillin, piperacillin-tazobactam), cephalosporins (ceftazidime, cefepime), monobactam (aztreonam), carbapenems (imipenem, meropenem), aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, amikacin), and fluoroquinolones
(ciprofloxacin, levofloxacin). The other isolates - resistant to none, one or two groups - were
categorized as non-MDR.

Within-host AMR diversity was assessed between intra-sample isolates by comparing 101 102 their profile (non-MDR, MDR, or XDR) and/or according to the relative standard deviation of the inhibition zone diameters within a given profile. Diversity was defined as follows: a major 103 discrepancy as a change to the next category (from non-MDR to MDR or MDR to XDR), 104 while a change from non-MDR to XDR was considered as a very major discrepancy. A minor 105 discrepancy was defined for isolates exhibiting the same AMR profile but with a distinct 106 categorization (susceptible, intermediate or resistant) to one or more antibiotic groups or with 107 a relative standard deviation $\geq 20\%$ for at least one of the 15 antibiotics tested. 108

To identify clinical risk factors for multidrug resistance (non-MDR *versus* MDR/XDR), patients exhibiting isolates with different AMR profiles were classified according to the most resistant one (for example, patients with non-MDR and MDR isolates were classified as MDR patients).

113

114 Multilocus sequence typing (MLST)

115 MLST was performed for two (in case of low-level bacteriuria) to three isolates per 116 urine culture selected to represent the phenotypic diversity (in terms of morphotype and AMR 117 profile).

MLST was carried out as previously described [dataset](14), except for the use of 118 newly designed primers (Table S1). Briefly, bacterial DNA was extracted by InstaGene 119 Matrix kit (Bio-Rad®) according to the manufacturer's recommendations. PCR products were 120 purified and sequenced by GENEWIZ Europe (Leipzig, Germany). Sequencing data were 121 aligned with BioEdit[©] (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Allelic profiles and 122 STs were assigned using the international PubMLST corresponding database 123 (https://pubmlst.org/paeruginosa/). New alleles and STs were submitted to these database. 124 Clinical and microbial data were upload into BioNumerics[©] software (Version 7.6, Applied 125 Maths, Belgium) in order to construct minimum spanning trees based on concatenated 126 sequences. 127

129 Statistical analyses

The Pearson's Chi-squared test or Fisher's exact tests were used to compare categorical data and Student *t* test, Mann-Withney U test or ANOVA test for continuous data, as appropriate. All tests were two-tailed, and significance was considered at *P-value* < 0.05. Statistical analyses were performed using R^{\odot} software (v.3.5.1).

135 **Results**

136

137 Demographic and clinical characteristics of the cohort of patients

The mean patient age was 64 years, ranging from 1 month to 101 years. 77 of the 120 patients (64%) were male (**Table 1**). Mean Charlson index was 5.4. Patients were mostly hospitalized in medical (n = 46 patients, 38%) or in surgery (n = 32 patients, 27%) wards. In the six months before inclusion, 86% were hospitalized, 68% underwent urinary tract manipulation, and 78% received at least one antibiotic treatment. The antibiotic classes mostly previously received by patients were penicillins (n = 72 patients, 60%), and cephalosporins (n = 43 patients, 36%) (**Table 2**).

Demographic or clinical characteristics significantly associated with UTI (P<0.05) were male sex (78% *versus* 58%), bacteraemia (30% *versus* 3%), and uncomplicated diabetes (32% *versus* 13%) (**Table 1**). The proportion of uncomplicated diabetes between adult male (16/71, 23%) and female (6/37, 14%) was not significantly different (P>0.05). Other frequently observed clinical features (such as urinary tract catheter and urinary comorbidities) were not significantly associated with clinical setting.

151

152 Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility was analysed for all the 591 isolates. Resistance rates ranged from 8% to 34% depending on antimicrobial groups, with lower rates ($\leq 10\%$) for cephalosporins and monobactam and higher rates ($\geq 25\%$) for fluoroquinolones (34%), carbapenems (27%) and penicillins (26%) (**Figure 1**). 444 isolates (75%) were non-MDR (including 318 wild-type isolates [54%]), 113 (19%) were MDR and 34 (6%) were XDR.

Urine culture positive for *P. aeruginosa* and antibiotic treatment (especially cephalosporins and quinolones) within the previous six months were found as risk factors for MDR and/or XDR profiles (P < 0.05) (**Table 2**). In addition, patients with resistant isolates received more different antimicrobial groups in the past six months, namely 1.5 for non-MDR, 2.6 for MDR, and 3.3 for XDR (**Table S2**).

For 106 of the 120 patients, all the isolates tested exhibited a same AMR profile within a given sample (87 with only non-MDR isolates [73%], 14 with only MDR [12%], and 5 with

only XDR [4%]). Of note, for 21 of these 106 patients, minor discrepancies for some 165 antibiotics were observed. Fourteen patients (12%) harbored isolates with two distinct AMR 166 profiles, corresponding to 13 major discrepancies (9 non-MDR/MDR, and 4 MDR/XDR) and 167 one very major (non-MDR/XDR). A total of 35 patients presented therefore within-host AMR 168 diversity. Comparison of clinical characteristics between patients with or without AMR 169 diversity revealed that urinary comorbidities, previous P. aeruginosa bacteriuria or previous 170 exposure to carbapenems or quinolones (P < 0.05) were more frequently observed in patient 171 with AMR diversity (Table 2). 172

173

174 Genotyping by MultiLocus Sequence Typing

A total of 64 STs was identified for the 358 isolates tested. 46 STS were singletons, as identified only in one patient (**Table S3**). The most predominant STs were ST395 and ST308 (n = 11 patients each), followed by ST253 (n = 7 patients), ST309 and ST235 (n = 6 patients)each).

179 29 STs were identified for the 120 UTI isolates, and 46 STs for the 238 AB isolates. 180 No strict correlation was found between STs and clinical setting (**Figure 2A**), as 11 of the 18 181 STs identified in at least two patients were observed in both UTI and AB contexts. Despite 182 this, ST309 (n = 6 patients) and ST298 (n = 4 patients) tended to be associated with AB and 183 UTI, respectively. Furthermore, 4 STs (ST308, ST235, ST111 and ST175) were mainly 184 associated with MDR and XDR profiles (**Figure 2B**).

Interestingly, five patients (4%; 2 with UTI and 3 with AB) harbored isolates with two 185 distinct STs. These STs differed for 4 to 7 alleles for four patients and for a single locus 186 (mutL) for one patient (Table S4). Within the limit of a small number of patients, this within-187 host genetic diversity seemed to occur preferentially in patients with prior hospitalization (all 188 the five patients), with urinary tract catheter (three patients), and urinary comorbidities (three 189 patients). Of note, within-host genetic diversity was always associated with within-host AMR 190 diversity, with either minor (two patients), major (two patients), or very major discrepancies 191 (one patient) (Table 2). 192

194 **Discussion**

195

To our knowledge, this is the first study to analyse several isolates of *P. aeruginosa* within a given urine sample, in the setting of UTI and AB. Moreover, even if numerous studies explored antibiotic susceptibility of urinary *P. aeruginosa* isolates, very few described their genetic diversity [dataset](9,10).

The main finding of this study was that *P. aeruginosa* isolates responsible for UTIs or ABs were highly diverse, in terms of AMR and genetic background, between patients but also within-host.

The patients enrolled in this study presented the characteristics previously described as 203 risk factors for P. aeruginosa UTI: male sex, urological disorder, urinary tract catheter and 204 previous UTI/antibiotic therapy/hospitalization [dataset](1,2,4). They also exhibited many 205 coexisting diseases as revealed by a high Charlson index value (5.4), and a high rate of 206 bacteraemia. This Charlson index was close to that observed in a study focused on patients 207 with P. aeruginosa UTI (3.6) [dataset](3). These characteristics were expected since 208 P. aeruginosa is mostly responsible for healthcare-associated UTI in weakened patients 209 [dataset](3,15). Similarly to a prospective study [dataset](16), we identified that 210 uncomplicated diabetes was significantly associated with P. aeruginosa UTI, probably 211 because hyperglycemic urine promotes rapid bacterial growth and that diabetic patients have 212 impaired immune functions with low intra-vesical cytokine level[dataset](16,17). 213

Because of its ability to acquire antimicrobial resistance, *P. aeruginosa* belongs to ESKAPE pathogens [dataset](18). Similarly to other studies [dataset](4,6,19), urinary isolates studied here exhibited a high rate of penicillins-, carbapenems-, and fluoroquinolones resistance. Interestingly, cephalosporins, such as ceftazidime, were effective against most isolates. This confirms that this agent keeps an important place in the therapeutic arsenal for *P. aeruginosa* UTIs [dataset](20).

Of note, the proportion of MDR (19%) and XDR (6%) isolates was between the rates of Gajdacs's [dataset](19) (using the EUCAST definition) and Gomila's [dataset](4) studies on *P. aeruginosa* urinary isolates where these rates varied respectively from 8.5% to 28.8% of MDR and from 1.7% to 12.3% of XDR isolates. Anyway, the rate of MDR/XDR isolates was similar to that reported worldwide (15 to 30%) [dataset](8). Previous *P. aeruginosa* bacteriuria and antibiotic use have been here identified as risk factors for MDR or XDR profiles. This antibiotic exposure could be related to treatments of previous UTI or other infections like acute respiratory tract infections. Indeed, patients of this cohort frequently had chronic pulmonary diseases, known to be a common indication of antibiotic therapy in adults [dataset](21,22). Likewise, Raman and colleagues identified that prior use of antibiotics (including carbapenems and quinolones) was significantly associated with the acquisition of MDR or XDR [dataset](23).

232

Limited studies are available on the genetic diversity of *P. aeruginosa* urinary isolates. 233 Among the many approaches available [dataset](24), we have chosen the most commonly 234 used, MLST [dataset](8). MLST analyses revealed no strict correlation between genotype and 235 clinical setting (AB or UTI). ST234 and ST235 clones, previously described for 236 P. aeruginosa urinary isolates [dataset](9,10), were identified in some of our isolates. 237 Although most of the STs were represented by single isolates, 13 of the 18 spread clones 238 reviewed by Oliver et al. [dataset](8) were identified in our population. Some of them were 239 mainly associated with multiresistance, including the three most predominant worldwide 240 epidemic high-risk clones (ST111, ST175, ST235) [dataset](8). 241

An innovative approach exploring several isolates per urine culture showed that almost 242 243 one-third of our patients exhibited within-sample AMR diversity. This was previously observed by Mowat et al. who analysed sets of 40 P. aeruginosa CF isolates per sputum 244 sample [dataset](11). Despite the lower number of isolates per sample explored here, the high 245 AMR diversity rate suggests that the urinary tract could be an environment as complex as the 246 CF lung and favour adaptation. This fact supports the recommendation to pool several 247 distinguishable colonies of P. aeruginosa when performing susceptibility testing and 248 antibiogram preparation [dataset](25). Another interesting possibility is to carry out a direct 249 AST by disk diffusion of urine specimen, whose congruence is 93.4% with standard AST 250 [dataset](26). This method provides a rapid solution for determining AST and may allow 251 identification of resistant subpopulations [dataset](26). 252

253

Our study is the first to demonstrate that *P. aeruginosa* UTIs or AB can be polyclonal, as two distinct STs were identified within a urinary sample for five patients (4%). For four of them, at least four alleles distinguished the two clones identified within a given urine sample, suggesting two distinct clones. Analysis of previous urine samples could have been of interest to establish whether the two clones already coexisted, especially for the two patients who had a history of bacteriuria due to *P. aeruginosa* within the previous six months. Moreover, these five patients were previously hospitalized, and four of them received antimicrobial treatments that could have selected resistant strains. Indeed, genetic diversity was always correlated with AMR diversity.

Nevertheless, the number of patients harbouring polyclonal bacteriuria was smaller than that described by Waine et *al.* [dataset](27), where 2 to 3 STs where identified for half of the 60 patients included but that study was based on a much larger number on isolates (from 27 to 46 isolates per sputum). Further studies with much more isolates per urine sample are therefore needed to evaluate within-sample diversity to a greater extent and to identify the impact of polyclonal UTI on antimicrobial treatments.

On the other hand, it would be interesting to further characterize isolates with the same ST 269 by whole genome sequencing given the high discriminatory power of this technology 270 [dataset](28,29). In this way, genomic comparisons of P. aeruginosa strains isolated from CF 271 [dataset](30) and non-CF patients [dataset](31) have showed that a parental strain could 272 diversify into distinct sublineages. This phenomenon could be identified for patients enrolled 273 of exhibited 274 here as 13% them а previous urine culture positive to P. aeruginosa. 275

276

Our study presented some limitations. First, it was a monocentric study, whose results 277 may not be generalized to other geographic areas. Nevertheless, isolates were collected from 278 multiple distinct clinical wards and the high proportion of singleton STs identified here (72%) 279 was in accordance with the proportion of singletons that characterize genetic diversity in 280 P. aeruginosa population structure [dataset](32). Next, symptoms at the time of bacteriuria 281 and clinical history were retrieved from the patients' electronic medical records; some clinical 282 data could thus be missing. Finally, conventional microbiological methods could 283 underestimate bacterial diversity in a given urine sample [dataset](33). Metagenomic studies 284 recently performed to explore urinary microbiome [dataset](34) would be interesting to apply 285 to patients with *P. aeruginosa* bacteriuria, in order to describe urinary populating isolates 286 287 more comprehensively and quantitatively.

In conclusion, this study provides strong evidence of within-host diversity of *P. aeruginosa* urinary isolates, whether phenotypic or genotypic. These findings can complicate diagnosis, treatment and control of UTI. Antimicrobial stewardship is therefore essential to prevent the emergence of MDR urinary isolates.

294 **Transparency declaration**

The authors report no conflicts of interest.

296

297 Acknowledgments

The authors are greatly thankful to Mathilde Réveillon, François Croustillères, and Delphine Feyeux for technical assistance; Fabien Aujoulat for his help with MLST experiments and Maxime Grand for his help with statistical analyses.

301

302 Author contribution

Author contributions included conception and design (AC, SD, MPC, EJB), collection of strains and clinical data (AC, AS, KA, ME, SD, MPC), experiments (AC, IZ), analysis and interpretation of data (AC, SD, KA, ME, MPC, EJB), and manuscript preparation (AC, SD, MPC). All authors amended and approved the final version of the manuscript.

307

309 **References**

- Zhang X, Niu S, Zhang L. Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Characterization of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Urinary Tract Infections. Urol Int. 2014;93(4):464-9.
- Djordjevic Z, Folic MM, Zivic Z, Markovic V, Jankovic SM. Nosocomial urinary tract infections caused by
 Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species: sensitivity to antibiotics and risk factors. Am J Infect
 Control. déc 2013;41(12):1182-7.
- Lamas Ferreiro JL, Álvarez Otero J, González González L, Novoa Lamazares L, Arca Blanco A, Bermúdez
 Sanjurjo JR, et al. Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and
 prognostic factors. PloS One. 2017;12(5):e0178178.
- Gomila A, Carratalà J, Eliakim-Raz N, Shaw E, Wiegand I, Vallejo-Torres L, et al. Risk factors and prognosis
 of complicated urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients: a
 retrospective multicenter cohort study. Infect Drug Resist. 2018;11:2571-81.
- 321 5. Nicolle L. Symptomatic urinary tract infection or asymptomatic bacteriuria? Improving care for the
 322 elderly. Clin Microbiol Infect. 1 juill 2019;25(7):779-81.
- Jiménez-Guerra G, Heras-Cañas V, Gutiérrez-Soto M, Del Pilar Aznarte-Padial M, Expósito-Ruiz M,
 Navarro-Marí JM, et al. Urinary tract infection by Acinetobacter baumannii and Pseudomonas
 aeruginosa: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. J Med Microbiol. juin
 2018;67(6):790-7.
- Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, Riu M, et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug
 resistant Pseudomonas aeruginosa acquisition. BMC Health Serv Res. 23 mai 2012;12(1):122.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk
 clones. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother. août 2015;21-22:41-59.
- Pobiega M, Maciąg J, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Pomorska-Wesolowska M, Ziołkowski G, et al.
 Molecular characterization of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from
 patients with urinary tract infections in Southern Poland. Diagn Microbiol Infect Dis. nov
 2015;83(3):295-7.
- Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Fukuda T, Takasaka A, Wakabayashi S, et al. Molecular characteristics
 of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from urine in Hyogo, Japan. Int J Urol.
 2019;26(1):127-33.
- Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ, Walshaw MJ, et al. Pseudomonas aeruginosa
 Population Diversity and Turnover in Cystic Fibrosis Chronic Infections. Am J Respir Crit Care Med. 15 juin
 2011;183(12):1674-9.
- Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, et al. Phenotypic
 heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa populations in a cystic fibrosis patient. PloS One.
 2013;8(4):e60225.
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant,
 extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim
 standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 1 mars 2012;18(3):268-81.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing
 scheme for the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. déc
 2004;42(12):5644-9.

- Venier A-G, Lavigne T, Jarno P, L'heriteau F, Coignard B, Savey A, et al. Nosocomial urinary tract infection
 in the intensive care unit: when should Pseudomonas aeruginosa be suspected? Experience of the French
 national surveillance of nosocomial infections in the intensive care unit, Rea-Raisin. Clin Microbiol Infect.
 1 janv 2012;18(1):E13-5.
- Ledizet M, Murray TS, Puttagunta S, Slade MD, Quagliarello VJ, Kazmierczak BI. The ability of virulence
 factor expression by Pseudomonas aeruginosa to predict clinical disease in hospitalized patients. PloS
 One. 2012;7(11):e49578.
- Sewify M, Nair S, Warsame S, Murad M, Alhubail A, Behbehani K, et al. Prevalence of Urinary Tract
 Infection and Antimicrobial Susceptibility among Diabetic Patients with Controlled and Uncontrolled
 Glycemia in Kuwait. J Diabetes Res [Internet]. 2016 [cité 17 mai 2019];2016. Disponible sur:
 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710901/
- 18. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J
 Infect Dis. 15 avr 2008;197(8):1079-81.
- Gajdács M, Burián K, Terhes G. Resistance Levels and Epidemiology of Non-Fermenting Gram-Negative
 Bacteria in Urinary Tract Infections of Inpatients and Outpatients (RENFUTI): A 10-Year Epidemiological
 Snapshot. Antibiot Basel Switz. 9 sept 2019;8(3).
- SF2H, SPILF, AFU. Révision des recommandations de bonne pratique pour la prise en charge et la
 prévention des Infections Urinaires Associées aux Soins (IUAS) de l'adulte [Internet]. 2015 [cité 12 déc
 2018]. Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/Recos/2015-RPC infections_urinaires_associees_aux_soins.pdf
- Harris AM, Hicks LA, Qaseem A, High Value Care Task Force of the American College of Physicians and for
 the Centers for Disease Control and Prevention. Appropriate Antibiotic Use for Acute Respiratory Tract
 Infection in Adults: Advice for High-Value Care From the American College of Physicians and the Centers
 for Disease Control and Prevention. Ann Intern Med. 15 mars 2016;164(6):425-34.
- Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. La consommation d'antibiotiques
 en France en 2016 [Internet]. 2017 [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/
- Raman G, Avendano EE, Chan J, Merchant S, Puzniak L. Risk factors for hospitalized patients with
 resistant or multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 4 juill 2018;7(1):79.
- Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal Pseudomonas
 aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis. Clin Microbiol Rev. oct 2018;31(4).
- Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and
 Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. Trends Microbiol. mai 2016;24(5):327-37.
- 26. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid
 and accurate tool for antibiotic stewardship. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin
 Microbiol. juin 2015;34(6):1207-12.
- Waine DJ, Honeybourne D, Smith EG, Whitehouse JL, Dowson CG. Cross-sectional and longitudinal
 multilocus sequence typing of pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis sputum samples. J Clin
 Microbiol. nov 2009;47(11):3444-8.
- Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and
 public health. Mol Biotechnol. mars 2005;29(3):245-54.
- 29. Chen J-W, Lau YY, Krishnan T, Chan K-G, Chang C-Y. Recent Advances in Molecular Diagnosis of
 Pseudomonas aeruginosa Infection by State-of-the-Art Genotyping Techniques. Front Microbiol

- 393 [Internet]. 28 mai 2018 [cité 20 sept 2019];9. Disponible sur:
- 394 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5985333/
- 30. Bianconi I, D'Arcangelo S, Esposito A, Benedet M, Piffer E, Dinnella G, et al. Persistence and
 Microevolution of Pseudomonas aeruginosa in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal
 Genomic Study. Front Microbiol. 2018;9:3242.
- 31. Hilliam Y, Moore MP, Lamont IL, Bilton D, Haworth CS, Foweraker J, et al. Pseudomonas aeruginosa
 adaptation and diversification in the non-cystic fibrosis bronchiectasis lung. Eur Respir J. 2017;49(4).
- Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment
 of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Infections. Clin
 Microbiol Rev. 18 sept 2019;32(4):e00031-19.
- 403 33. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, et al. The human urinary microbiome;
 404 bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:41.
- 405 34. Moustafa A, Li W, Singh H, Moncera KJ, Torralba MG, Yu Y, et al. Microbial metagenome of urinary tract
 406 infection. Sci Rep [Internet]. 12 mars 2018 [cité 24 sept 2020];8. Disponible sur:
 407 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5847550/

Tables

Table 1

Demographics and clinical features for all *P. aeruginosa* bacteriuria cases assessed as urinary tract infection (UTI) or asymptomatic bacteriuria (AB)

	Entire cohort	ITT	ΔB	
Characteristics	(n=120)	(n=40)	(n=80)	Р
Demographics <i>n</i> (%)	(11 120)	(11 10)	(11 00)	
Age (years) [min;max]	64 [0;101]	62 [0;101]	65 [1;96]	0.55
Male gender	77 (64%)	31 (78%)	46 (58%)	0.031
5	. ,			
Clinical features n (%)				
Urinary tract catheter	60 (50%)	21 (53%)	39 (49%)	0.70
Bacteraemia caused by P. aeruginosa	9/60 (15%)	8/27 (30%)	1/33 (3%)	<0.005
Comorbid diseases n (%)				
Urinary comorbidities	61 (51%)	23 (58%)	38 (48%)	0.30
Benign prostatic hyperplasia	25/77 (32%)	7/31 (23%)	18/46 (39%)	0.15
Neurogenic bladder	12 (10%)	3 (8%)	9 (11%)	0.52
Genitourinary abnormality	9 (8%)	5 (13%)	4 (5%)	0.14
Urinary diversion	9 (8%)	3 (8%)	6 (8%)	1
Kidney transplant	8 (7%)	4 (10%)	4 (5%)	0.30
Nephrolithiasis	6 (5%)	4 (10%)	2 (3%)	0.076
Charlson index (m (SD))*	54+20	50 + 24	56 21	0.26
Myocardial infarct	3.4 ± 2.9	5.0 ± 2.4	3.0 ± 3.1	0.20
Congestive heart failure	2(2%)	6 (16%)	2 (3%) 5 (7%)	0.10
Peripheral vascular disease	14 (12%)	5(14%)	9(12%)	0.78
Cerebrovascular disease	20(18%)	5 (14%) 6 (16%)	14(18%)	0.80
Dementia	24 (21%)	7 (19%)	17 (22%)	0.70
Chronic pulmonary disease	28 (25%)	6 (16%)	22 (29%)	0.15
Connective tissue disease	15 (13%)	3 (8%)	12 (16%)	0.27
Ulcer disease	5 (4%)	3 (8%)	2 (3%)	0.18
Mild liver disease	5 (4%)	1 (3%)	4 (5%)	0.54
Uncomplicated diabetes	22 (19%)	12 (32%)	10 (13%)	0.014
Diabetes mellitus with end organ damage	12 (11%)	3 (8%)	9 (12%)	0.56
Hemiplegia	15 (13%)	5 (14%)	10 (13%)	0.94
Moderate or severe renal disease	25 (22%)	5 (14%)	20 (26%)	0.13
Localized tumor	29 (25%)	9 (24%)	20 (26%)	0.85
Metastatic solid tumor	4 (4%)	0 (0%)	4 (5%)	/
Leukemia	2 (2%)	1 (3%)	1 (1%)	0.59
Other comorbidities	12(10%)	4 (10%)	8 (10%)	1
Non-genitourinary transplant	2 (2%)	2 (5%)	0 (0%)	/
Immunocompromised conditions ^a	10 (8%)	2 (5%)	8 (10%)	0.35
Clinical wards n (%)				
Medicine	46 (38%)	14 (35%)	32 (40%)	
Surgery	32 (27%)	12 (30%)	20 (25%)	
Intensive care	22 (18%)	8 (20%)	14 (18%)	0.84
Rehabilitation care	13 (11%)	3 (8%)	10 (13%)	
Pediatry	7 (6%)	3 (8%)	4 (5%)	
Clinical histories within 6 months n (%)				
Previous urine culture positive to <i>P. aeruginosa</i>	15 (13%)	4 (10%)	11 (14%)	0.56
Previous antibiotic treatment	93 (78%)	34 (85%)	59 (74%)	0.16
Previous hospitalization	103 (86%)	35 (88%)	68 (85%)	0.71
Previous urinary tract manipulation	82 (68%)	27 (68%)	55 (69%)	0.89
Including previous urological surgery	21 (18%)	9 (23%)	12 (15%)	0.31

*Charslon index was measured only for adult cases (i.e. 114 patients, 37 with UTI, and 77 with AB)

^a Immunocompromised conditions excluded disease included in the Charlson index (AIDS, lymphoma, leukemia)

or post-transplant immunosuppressor treatment (specificly classified into renal transplant or non-genitourinary transplant)

n : number; min: minimum; max: maximum; m: average; SD: standard deviation; P: P-value

Table 2

Clinical risk factors for multidrug resistant or extensively drug resistant profiles and for within-host diversity

		AMR profiles			Within-host diversity			
Characteristics	Entire cohort	Non-MDR MDR/XDR	MDR/XDR	P	No diversity	AMR diversity	р	Genetic diversity
	(n=120)	(n=87)	(n=33)	1	(n=85)	(n=35)	1	(n=5)
Demographics n (%)								
Age (years) [min;max]	64 [0;101]	65 [0;101]	62 [22;95]	0.43	64 [0;97]	64 [1;101]	0.90	54 [36;83]
Male gender	77 (64%)	56 (64%)	21 (64%)	0.94	55 (65%)	22 (63%)	0.85	4 (80%)
Clinical features n (%)								
Urinary tract infection	40 (33%)	28 (32%)	12 (36%)	0.66	28 (33%)	12 (34%)	0.89	2 (40%)
Urinary tract catheter	60 (50%)	39 (45%)	21 (64%)	0.066	42 (49%)	18 (51%)	0.84	3 (60%)
Bacteraemia caused by P. aeruginosa	9/60 (15%)	8/41 (20%)	1/19 (5%)	0.15	8/43 (19%)	1/17 (6%)	0.21	0/2 (0%)
Comorbid diseases n (%)								
Urinary comorbidity	61 (51%)	43 (49%)	18 (55%)	0.62	40 (47%)	21 (60%)	0.20	3 (60%)
Charlson index (m±SD)*	5.4 ± 2.9	5.6 ± 2.9	4.94 ± 2.8	0.24	5.4 ± 3.0	5.4 ± 2.5	0.93	3.2 ± 2.2
Other comorbidity	12 (10%)	7 (8%)	5 (15%)	0.25	9 (11%)	3 (9%)	0.74	0 (0%)
Clinical histories within the previous 6 months n (%)								
Previous urine culture positive to P. aeruginosa	15 (13%)	6 (7%)	9 (27%)	<0.005	8 (9%)	7 (20%)	0.11	2 (40%)
Previous antibiotic treatment	93 (78%)	61 (70%)	32 (97%)	< 0.005	65 (77%)	28 (80%)	0.67	4 (80%)
Penicillins	72 (60%)	49 (56%)	23 (70%)	0.21	50 (59%)	22 (63%)	0.84	1 (20%)
Cephalosporins	43 (36%)	26 (30%)	17 (52%)	0.034	31 (36%)	12 (34%)	0.99	1 (20%)
Carbapenems	12 (10%)	6 (7%)	6(18%)	0.088	5 (6%)	7 (20%)	0.039	2 (40%)
Aminoglycosides	25 (21%)	14 (16%)	11 (33%)	0.047	17 (20%)	8 (23%)	0.81	0(0%)
Quinolones	22 (18%)	9 (10%)	13 (39%)	<0.001	11 (13%)	11 (31%)	0.035	1 (20%)
Other antimicrobials	52 (43%)	30 (34%)	22 (67%)	<0.005	35 (41%)	17 (49%)	0.54	2 (40%)
Previous hospitalization	103 (86%)	74 (85%)	29 (88%)	0.69	73 (86%)	30 (86%)	0.98	5 (100%)
Previous urinary tract manipulation	82 (68%)	57 (66%)	25 (76%)	0.28	59 (69%)	23 (66%)	0.69	3 (60%)
Including previous urological surgery	21 (18%)	15 (17%)	6(18%)	0.90	17 (20%)	4 (11%)	0.26	1 (20%)

*Charslon index was measured only for adult cases (i.e. 114 patients, 37 with UTI, and 77 with AB)

MDR: multidrug resistant; XDR: extensively drug resistant; AMR: antimicrobial resistance

n: number; min: minimum; max: maximum; m: average; SD: standard deviation; P: P-value

Figures



Figure 1. Overall resistance rates of the 591 P. aeruginosa urinary isolates to antimicrobial groups.

Overall resistance rates are presented for each antimicrobial group in bold, above the bar chart. Percentage of non-MDR (MultiDrug Resistant), MDR, and XDR (eXtensively Drug Resistant) phenotypes are indicated for each antimicrobial group inside the bar chart.



Figure 2. Minimum spanning tree of the 358 *P. aeruginosa* urinary isolates typed by multilocus sequence typing (MLST)

The sequences were concatenated and analyzed in BioNumerics[®]. The colors used are based (A) on clinical contexts (AB: Asymptomatic Bacteriuria; UTI: Urinary Tract Infection) and (B) on antimicrobial resistance profiles (MDR: MultiDrug Resistant; XDR: eXtensively Drug Resistant). Each circle represents a sequence type (ST) and its size is proportional to the number of isolates. Length of the lines represent the genetic distance between isolates. STs identified in at least two patients are annotated, and the three most prevalent worldwide epidemic high-risk clones [dataset](8) (B) are in bold.

Supplementary data

Table S1

Primers used for multilocus sequence typing (MLST)

Locus	Primers	Sequences	References
acsA	acsA-F_[A]	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	[dataset](14)
	acsA-R_[A]	GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT	[dataset](14)
	acsA-F_[S]	CGACTACCGTCCGGGCGAAGT	This study
	acsA_R_[S]	TCATGGTCGCCGAACAGGGTC	This study
aroE	aroE-F_[A]	TGGGGCTATGACTGGAAACC	[dataset](14)
	aroE-R_[A]	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	[dataset](14)
	aroE-F_[S]	TGGTCTATGACGCGCAACTGG	This study
	aroE-R_[S]	CAACTGTCGGCGCAGCGTCTC	This study
guaA	guaA-F_[A]	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	[dataset](14)
	guaA-R_[A]	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	[dataset](14)
	guaA-F_[S]	CCCGGAAGTCACCCACACCAA	This study
	guaA-R_[S]	CCCAGCTCCAGGCCGATCTTG	This study
mutL	mutL-F_[A]	GGTAGCGCGCCTGACCATGAC	This study
	mutL-R_[AS]	GCCGGACTCTCCAGCACGCTC	This study
	mutL-F_[S]	ACCGAGGGCCGCGACATGCAG	This study
nuoD	nuoD-F_[A]	CGCCACCGAGTTCGATCCCTACT	This study
	nuoD-R_[A]	GATACCCTTGGTCGCCTCGATCAT	This study
	nuoD-F_[S]	TCCCTGTCCGCCGCCAAGCAG	This study
	nuoD-R_[S]	GGAACTCGCGGACCAGCTTGT	This study
ppsA	ppsA-F_[A]	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	[dataset](14)
	ppsA-R_[A]	GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG	[dataset](14)
	ppsA-F_[S]	GGCCGCCCGATGGACATCGAA	This study
	ppsA-R_[S]	GGATTGCCGACGTTCATCATG	This study
trpE	trpE-F_[A]	GCGGCCCAGGGTCGTGAG	[dataset](14)
	trpE-R_[AS]	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	[dataset](14)
	trpE-F_[S]	CGCAGCGCATGTCCATCGAAT	This study

F: Forward primer; R: Reverse primer; [A]: primer for PCR amplification; [S]: primer for Sanger sequencing

Table S2

Number of antimicrobial groups received by the 120 patients within the previous 6 months, according to antimicrobial profile and clinical context

	Entire cohort	UTI cases	AB cases	
	(n=120)	(n=40)	(n=80)	
Non-MDR	1.5	1.7	1.5	
MDR	2.6	2.8	2.4	
XDR	3.3	2.0	3.6	

STs	Nb of patient	Nb of isolate
395	11	33
308	11	32
253	7	20
309	6	18
235	6	17
446	5	13
244, 298	4	12
111, 313, 389	3	9
27	3	8
207	3	5
17, 560, 1248	2	6
683	2	5
3233	2	4
132, 170, 175, 232, 233, 234, 252, 254, 258, 261, 274, 291, 316, 319, 379, 381,		
386, 390, 527, 532, 633, 676, 701, 769, 1028, 1076, 1125, 1270, 2125, 2128, 2438,	1	3
2445, 2554, 2683, 2859, 3225, 3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231, 3234		
483, 2406	1	2
3232	1	1

 Table S3

 Sequence types (STs) identified by multilocus sequence typing (MLST) for the 358 P. aeruginosa isolates

Ten new STs were incorporated in the online database (https://pubmlst.org/paeruginosa/), three of them being defined by new alleles (for *aroE*, *mutL*, and *ppsA*).

Table S4

P. aeruginosa within-host genetic diversity

Isolates	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	<i>trpE</i>	STs
5-1	4	4	16	12	1	6	3	253
5-2	4	4	16	12	1	6	3	253
5-11	47	4	5	33	1	6	40	207
64-1	29	8	36	67	1	6	3	2406
64-2	29	8	36	67	1	6	3	2406
64-5	29	8	36	228	1	6	3	3232
87-1	13	4	5	5	12	7	15	308
87-2	13	4	5	5	12	7	15	308
87-4	47	4	5	33	1	6	40	207
142-1	6	5	11	3	4	4	1	683
142-2	87	34	114	37	86	91	170	3233
142-5	6	5	11	3	4	4	1	683
169-1	18	4	5	3	1	17	13	446
169-8	116	5	6	5	3	12	68	483
169-9	116	5	6	5	3	12	68	483

The seven alleles (acsA, aroE, guaA, mutL, nuoD, ppsA and trpE) that defined sequence type (ST) are indicated here.

II.2. Principaux résultats

II.2.1. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients inclus dans la cohorte

Les bactériuries à *P. aeruginosa* étaient principalement retrouvées chez des patients de plus de 60 ans (âge moyen de 64 ans) et présentant des comorbidités (score de Charlson moyen de 5,4). Les patients étaient majoritairement hospitalisés dans les pôles de médecine (46 patients, 38%) ou de chirurgie (32 patients, 27%).

P. aeruginosa était principalement identifié chez des patients présentant des explorations ou interventions au niveau du tractus urinaire (68%), ayant été hospitalisés (86%) ou ayant reçu des cures d'antibiotiques (78%) dans les 6 mois précédant l'ECBU. Les principales familles d'antibiotiques reçues dans ces 6 derniers mois étaient les pénicillines (72 patients, 60%) et les céphalosporines (43 patients, 36%).

Trois paramètres démographiques et cliniques étaient significativement associés au contexte d'IU (P<0.05) : le sexe masculin (78% *versus* 58%), le diabète (32% *versus* 13%) et une bactériémie associée (30% *versus* 3%). La proportion de patients diabétiques ne différait pas significativement selon le genre (23% pour les hommes contre 14% pour les femmes). D'autres données cliniques (telles que la présence d'un cathéter urinaire ou d'une pathologie de l'arbre urinaire) n'étaient pas significativement associées à un contexte clinique d'IU ou de BA.

II.2.1. Sensibilité des isolats aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée sur 591 isolats (2 [en cas de faible bactériurie] à 5 isolats par ECBU). Le taux de résistance variait de 8% (pour les céphalosporines) à 34% (pour les fluoroquinolones). 444 isolats (75%) ont présenté un profil non-MDR (dont 318 [54%] étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés), 113 (19%) un profil MDR et 34 (6%) un profil XDR.

Des facteurs de risque de résistance (non-MDR *versus* MDR ou XDR) ont été identifiés : un antécédent de bactériurie à *P. aeruginosa* ou d'antibiothérapie (notamment les céphalosporines et les quinolones) dans les 6 mois. En effet, les patients présentant des isolats non-MDR, MDR et XDR avaient reçu 1.5, 2.6 et 3.3 familles d'antibiotiques différentes durant les 6 derniers mois, respectivement.

Une diversité intra-ECBU, en termes d'antibiorésistance, a été identifiée pour 35 patients (28%). Cette diversité était associée chez 21 patients à des discordances mineures (isolats présentant le même profil d'antibiorésistance mais avec une catégorisation distincte [sensible, intermédiaire ou résistant] à un ou plusieurs groupes d'antibiotiques ou avec un écart-type relatif \geq 20% pour au moins l'un des 15 antibiotiques testés), chez 13 patients à des discordances majeures (passage à la catégorie suivante, de non-MDR à MDR ou MDR à XDR) et très majeure (passage de non-MDR à XDR) chez un patient. Cette diversité était significativement associée à une prise de carbapénèmes ou de quinolones durant les 6 mois précédant la bactériurie (*P*<0.05).

II.2.2. Typage par MLST

L'analyse par MLST a été effectuée sur 358 isolats (2 [en cas de faible bactériurie] à 3 par ECBU), choisis pour refléter la diversité phénotypique au sein de l'ECBU, en termes de morphologie des colonies et de profils de sensibilité aux antibiotiques. Au total, 64 STs ont été identifiés. Dix nouveaux STs ont été inclus dans la base de données PubMLST (https://pubmlst.org/paeruginosa/).

Les clones prédominants étaient de ST395 et ST308 (11 patients chacun), de ST253 (7 patients) ou de ST309 et ST235 (6 patients chacun). Vingt-neuf STs ont été identifiés parmi les 120 isolats collectés lors d'IU, contre 46 STs parmi les 238 isolats collectés au cours de BA. Aucune corrélation stricte n'a été mise en évidence entre STs et contexte clinique d'IU ou de BA, 11 des 18 STs identifiés chez au moins deux patients étant identifiés au cours des deux contextes cliniques. Par ailleurs, des isolats de 4 STs ont été identifiés comme associés à des profils XDR, parmi lesquels les trois clones épidémiques à haut risque les plus prévalents au niveau mondial (ST111, ST175 et ST235) (Oliver et al., 2015).

De façon intéressante, 5 patients avaient des isolats appartenant à différents STs (4%, 2 IU et 3 BA polyclonales). Pour 4 d'entre eux, ces STs différaient pour 7 allèles (2 patients), 5 allèles (1 patient) et 4 allèles (1 patient). Malgré la limite liée au faible nombre de patients, une précédente hospitalisation, la présence d'un cathéter, une pathologie du tractus urinaire ou encore une diversité intra-ECBU en termes d'antibiorésistance semblaient associés à cette diversité génétique intra-ECBU.

Cette étude montre une grande diversité moléculaire des isolats urinaires de *P. aeruginosa*, indépendamment de leur contexte clinique d'isolement. Celle-ci a même été identifiée au sein d'un même prélèvement. Ainsi, des infections urinaires polyclonales à *P. aeruginosa* ont été décrites pour la première fois. En parallèle, une diversité phénotypique, en termes de résistance aux antibiotiques, a été observée.

Cette coexistence de sous-populations différentes pourrait compliquer l'évaluation *in vitro* de la sensibilité des souches aux antibiotiques ainsi que la prise en charge de ces infections urinaires fréquemment associées aux soins, sur matériel.
III. Second travail personnel

III.1. Publication n° 2

Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* urinary isolates: a seven-patient longitudinal genomic and phenotypic study

<u>Agnès Cottalorda</u>, Marie Leoz, Sandrine Dahyot, François Gravey, Maxime Grand, Thomas Froidure, Fabien Aujoulat, Simon Le Hello, Estelle Jumas-Bilak, Martine Pestel-Caron

Article soumis le 28 septembre 2020 dans la revue Frontiers in Microbiology.

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée dans un congrès international (ECCMID, Paris, 2020).



Within-host microevolution of Pseudomonas aeruginosa urinary isolates: a seven-patient longitudinal genomic and phenotypic study

Agnès Cottalorda^{1*}, Marie Leoz¹, Sandrine Dahyot^{1, 2}, François Gravey³, Maxime Grand¹, Thomas Froidure¹, Fabien Aujoulat⁴, Simon LE HELLO³, Estelle Jumas-Bilak⁴, Martine Pestel-Caron^{1, 2}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM 2.0 EA2656, F-76000, France, ²Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, France, ³Normandie Université, France, ⁴HydroSciences Montpellier, France

Submitted to Journal: Frontiers in Microbiology

Specialty Section: Evolutionary and Genomic Microbiology

Article type: Original Research Article

Manuscript ID: 611246

Received on: 28 Sep 2020

Revised on: 01 Oct 2020

Frontiers website link: www.frontiersin.org



Conflict of interest statement

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

Author contribution statement

Author contributions included conception and design (AC, SD, MPC, EJB), phenotypic experiments (AC, MG, TF), genomic analyses (AC, ML) and interpretation of data (AC, ML, MG, FG, FA, SLH), and manuscript preparation (AC, SD, MPC). All authors amended and approved the final version of the manuscript.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, Urinary isolates, whole genome sequencing, within-host evolution, Single nucleotide polymorphism, Large genomic deletion

Abstract

Word count: 268

Background: Pseudomonas aeruginosa is responsible for up to 10% of healthcare associated urinary tract infections (UTI), which can be difficult to treat and can lead to bacterial persistence. While numerous whole genome sequencing (WGS) analyses have explored within-host genomic adaptation and microevolution of P. aeruginosa during cystic fibrosis (CF) infections, little is known about P. aeruginosa adaptation to the urinary tract.

Results: WGS was performed on 108 P. aeruginosa urinary isolates, including up to 5 isolates collected from 2 to 5 successive urine samples from 7 patients hospitalized in a French hospital over 48 to 488 days. Clone type single nucleotide polymorphisms (ctSNPs) analysis revealed that each patient was colonized by a single clone type (< 6000 SNPs between two isolates) at a given time and over time. However, 0 to 126 SNPs/genome/year were detected over time. Furthermore, large genomic deletions (1 to 5% of the genome) were identified in late isolates from 3 patients. For 2 of them, a convergent deletion of 70 genes was observed. Genomic adaptation (SNPs and deletion) occurred preferentially in genes encoding transcriptional regulators, two-component systems, and carbon compound catabolism. This genomic adaptation was significantly associated with a reduced fitness, particularly in artificial urine medium, but no strict correlation was identified between genomic adaptation and biofilm formation.

Conclusion: This study provides the first insight into P. aeruginosa within-host evolution in the urinary tract. It was driven by mutational mechanisms and genomic deletions and could lead to phenotypic changes in terms of fitness and biofilm production. Further metabolomic and phenotypic analyses are needed to describe in-depth genotype-phenotype associations in this complex and dynamic host-environment.

Contribution to the field

Pseudomonas aeruginosa is frequently responsible for healthcare-associated urinary tract infections, particularly in patients with urinary catheter. Because of its ability to resist to numerous available antimicrobial agents and to form biofilm on medical devices, P. aeruginosa eradication can be difficult. While many studies have explored within-host evolution of P. aeruginosa during cystic fibrosis infections, phenotypic and molecular mechanisms involved in P. aeruginosa adaptation to urinary tract are unknown to date. In this context, we have applied whole genome sequencing to multiple isolates collected from urine specimens sampled simultaneously and longitudinally from seven patients to develop a picture of the various processes involved in within-host P. aeruginosa evolution. Next, we have explored phenotypic changes associated with the genomic adaptations observed. The main strength of this study is to describe for the first time, that within-host evolution of P. aeruginosa urinary isolates was driven by single nucleotide polymorphisms and large genomic deletions, which could impact biofilm formation and fitness.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: Written informed consent was not obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Data availability statement

Generated Statement: The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, Bioproject PRJNA656414.



Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* urinary isolates: a seven-patient longitudinal genomic and phenotypic study

Agnès Cottalorda^{1*}, Marie Leoz¹, Sandrine Dahyot^{1,2}, François Gravey³, Maxime Grand¹,

5 Thomas Froidure¹, Fabien Aujoulat⁴, Simon Le Hello ³, Estelle Jumas-Bilak⁴, Martine Pestel 6 Caron^{1,2}

7

1

- ⁸ ¹Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM 2.0 EA2656, F-76000 Rouen, France
- ⁹ ²Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM 2.0 EA2656, Rouen University Hospital, Department of
- 10 Bacteriology, F-76000 Rouen, France
- ³Normandie Univ, UNICAEN, GRAM 2.0 EA2656, F-14000 Caen, France
- 12 ⁴Team Pathogènes Hydriques Santé Environnement, UMR 5569 HydroSciences Montpellier, Unité
- 13 de Bactériologie, UFR Pharmacie, University of Montpellier, France
- 14
- 15 *** Correspondence:**
- 16 Agnès Cottalorda
- 17 agnes.cottalorda@hotmail.fr
- 18
 19 Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, urinary isolates, whole genome sequencing, within-host
- 20 evolution, single nucleotide polymorphism, large genomic deletion
- 21
- 22 Running title: Pseudomonas aeruginosa adaptation urinary tract
- 23

24

25 Abstract

26 Background: *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for up to 10% of healthcare associated urinary

- tract infections (UTI), which can be difficult to treat and can lead to bacterial persistence. While numerous whole genome sequencing (WGS) analyses have explored within-host genomic adaptation
- and microevolution of *P. aeruginosa* during cystic fibrosis (CF) infections, little is known about *P.*
- 30 *aeruginosa* adaptation to the urinary tract.

31 Results: WGS was performed on 108 P. aeruginosa urinary isolates, including up to 5 isolates collected from 2 to 5 successive urine samples from 7 patients hospitalized in a French hospital over 32 48 to 488 days. Clone type single nucleotide polymorphisms (ctSNPs) analysis revealed that each 33 patient was colonized by a single clone type (< 6000 SNPs between two isolates) at a given time and 34 35 over time. However, 0 to 126 SNPs/genome/year were detected over time. Furthermore, large genomic deletions (1 to 5% of the genome) were identified in late isolates from 3 patients. For 2 of them, a 36 37 convergent deletion of 70 genes was observed. Genomic adaptation (SNPs and deletion) occurred 38 preferentially in genes encoding transcriptional regulators, two-component systems, and carbon 39 compound catabolism. This genomic adaptation was significantly associated with a reduced fitness, 40 particularly in artificial urine medium, but no strict correlation was identified between genomic 41 adaptation and biofilm formation.

42 **Conclusion:** This study provides the first insight into *P. aeruginosa* within-host evolution in the 43 urinary tract. It was driven by mutational mechanisms and genomic deletions and could lead to 44 phenotypic changes in terms of fitness and biofilm production. Further metabolomic and phenotypic 45 analyses are needed to describe in-depth genotype-phenotype associations in this complex and dynamic 46 host-environment.

47

48

49 **1** Introduction

50 Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram negative pathogen, responsible for 7-10% of 51 healthcare associated urinary tract infections (UTIs) (Lamas Ferreiro et al., 2017). These UTIs preferentially occur in patients with underlying conditions, including patients with indwelling urinary 52 53 catheter (Djordjevic et al., 2013; Gomila et al., 2018). P. aeruginosa can adhere and form biofilm on 54 such surfaces (Olivares et al., 2019), which limits antibiotic diffusion and promotes emergence of antimicrobial resistant strains (Olivares et al., 2019; Soares et al., 2020). Moreover, this allows the 55 56 microorganism to elude the immune system and persist causing frequent relapses (Gomila et al., 2018). 57 Thus, readmissions are more frequent when UTIs are caused by *P. aeruginosa* (Gomila et al., 2018).

Advances in whole genome sequencing (WGS) techniques have made it possible to explore within-

host genomic adaptation and microevolution of *P. aeruginosa*, particularly during cystic fibrosis (CF)
 infections (Marvig et al., 2015a; Bartell et al., 2019; La Rosa et al., 2019). Within-host evolution in CF

patients is driven by three evolutionary modes, including general or directed diversity (Bartell et al.,
 2019), and convergent molecular evolution (Marvig et al., 2015b; Bartell et al., 2019). For example,

the whole genome analysis of 474 longitudinal *P. aeruginosa* isolates collected from 34 CF patients

64 led to the identification of a convergent evolution of 52 genes (Marvig et al., 2015b). These genes were

65 involved in regulatory networks, central metabolism, antimicrobial resistance and secretion of
 66 virulence factors. Adaptive trajectories can also result in loss events which were described to be more

67 frequent than gene acquisition (Rau et al., 2012; Bianconi et al., 2018) and could be characterized by

large genomic deletions (Rau et al., 2012; Cabot et al., 2016; Hocquet et al., 2016).

Even though identification of genotype-phenotype links can be difficult for complex traits governed by multiple regulatory networks (Bartell et al., 2019), phenotypic changes have been previously

71 described during persistent CF infections. They included a decreased secretion of virulence factors, the

- 72 emergence of hypermutable strains often associated with an increased antimicrobial resistance, a
- 73 switch from planktonic to sessile lifestyle, or a phenotypic conversion to mucoid or rugose small colony
- variants (Cabot et al., 2016; Hocquet et al., 2016; Winstanley et al., 2016; Klockgether and Tümmler,
- 75 2017; Pestrak et al., 2018; Colque et al., 2020).
- 76 In contrast, no study has explored to date *P. aeruginosa* within-host genomic and phenotypic evolution
- in the urinary tract. Indeed, most of the whole genome sequences of *P. aeruginosa* urinary isolates
- currently consist in genome announcements (Tielen et al., 2014; Wibberg et al., 2014, 2015; Vorhölter
- 79 et al., 2015; Hussain et al., 2017).
- 80 In this context, we sequenced the whole genome of sequential urinary isolates of 7 patients colonized
- 81 and/or infected by *P. aeruginosa* to analyze the nature and extent of their genomic changes and provide
- 82 an overview of within-host *P. aeruginosa* diversity at a given time and over time. We have also
- 83 explored the impact of genomic changes on phenotypic traits such as fitness and biofilm formation.
- 84 85

86 2 Materials and methods

87 2.1 Bacterial isolates and clinical data

Two to five monomicrobial urine cultures (named I to V) of P. aeruginosa (whatever leucocyturia) 88 89 were prospectively and consecutively collected from 7 patients (A to G) over a 27-months period (from 90 June 2016 to August 2018), with up to five isolates per sample (1 to 5), representing a total of 108 91 isolates (Table 1, Figure 1). Isolates from the first sample collected were considered as early isolates 92 while those from samples obtained at the subsequent times were considered as late isolates. Clinical 93 data were collected from computerized medical and biological records of the hospital in parallel with 94 the collection of the urinary isolates. According to the French regulation on observational database 95 analyses, this study did not need specific informed consent requirements; it was registered by the Directorate of Clinical Research and Innovation of the Rouen University Hospital Centre under the 96 number 2018/413/OB. The patients had episodes of UTI and/or asymptomatic bacteriuria (AB) 97 averaging 192 days apart (ranging from 48 to 488 days). 98 99

- Bacterial isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
 (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and stored at -80°C
 for further analyses.
- 102

103 **2.2** Antibiotic susceptibility testing

104 Antibiotic susceptibility testing (AST) was performed for all isolates by disk diffusion method on 105 Mueller-Hinton agar (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France) according to the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (https://www.eucast.org/). Antibiotic 106 107 disks were purchased from Bio-Rad®. Consensus recommendations (Magiorakos et al., 2012) were 108 used to evaluate the proportion of MultiDrug-Resistant (MDR, not susceptible to at least three antimicrobial groups) and eXtensively Drug Resistant (XDR, not susceptible to at least six 109 110 antimicrobial groups) isolates, considering the following six antimicrobial groups: penicillin 111 piperacillin-tazobactam), (ticarcillin, piperacillin, ticarcilline-clavulanate, cephalosporins 112 (ceftazidime, cefepime), monobactams (aztreonam), carbapenems (imipenem, meropenem), 113 aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, amikacin), and fluoroquinolones (ciprofloxacin, 114 levofloxacin). The other isolates - resistant to none, one or two classes of antipseudomonal agents -115 were defined as non-MDR. The P. aeruginosa strain ATCC 27853 was used as a quality control strain 116 in each experiment.

- 117 Of note in a parallel study [Cottalorda and *al.*, in preparation], the antimicrobial resistance profiles,
- 118 identified for isolates collected from the first urine sample, were also explored for these 7 patients.
- 119
- 120

121 **2.3 DNA** extraction, library construction, genome sequencing, and *de novo* assembly

122 **2.3.1 PacBio library construction and sequencing**

- For each patient, the first sample isolate with the higher rate of antimicrobial resistance (named X-I-1 123 124 where X was a capital letter from A to G) was sequenced with the Pacific Biosciences (PacBio) 125 technology. It was considered as the intra-patient reference sequence. Genomic DNA was extracted using the Nucleospin Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Illkirch, France) according to the 126 127 manufacturer's recommendations. The SMRTBell library was prepared using a SMRTbell Express 2 Template prep kit (Pacific Biosciences[®], California Inc., USA), following the "procedure and checklist 128 preparing Multiplexed Microbial Libraries using SMRTbell Express Template prep kit 2.0" protocol. 129 130 Single-molecule Real-time long reads sequencing was performed at the Gentyane Sequencing Platform (Clermont-Ferrand, France) with a PacBio Sequel Sequencer (Pacific Biosciences[®], Menlo Park, CA, 131 132 USA). De novo assembly was performed using "Microbial Assembly" pipeline in PacBio SMRT Link 133 v8.0.0.80529, using default parameters, except "Genome Size", which was set to X.
- 134

135 2.3.2 Illumina NextSeq 500 library construction

The genome of the 101 remaining isolates was sequenced by the "Plateforme de Microbiologie Mutualisée P2M" (Institut Pasteur, Paris, France) using the MagNA Pure 96 Instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) for genomic DNA extraction, and the Nextera XT library kit (Illumina Inc.), the NextSeq 500 sequencing system (Illumina Inc.). Paired-end reads were submitted to preprocessing using fqCleanER and to *de novo* assembly using SPADES, with a 50X minimum average sequencing depth.

142

143 **2.4** Genome annotation, genotyping, clone type definition

Genome annotation was performed for the 7 isolates sequenced by PacBio using the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) version 2019-08-22 (Tatusova et al., 2016) (https://github.com/ncbi/pgap/).

In silico MultiLocus Sequence Typing (MLST) genotyping was performed according to the scheme
 established by Curran *et al.* (Curran et al., 2004), using KMA software version 1.2.12 (Clausen et al.,
 with default settings (<u>https://bitbucket.org/genomicepidemiology/kma.git</u>), and the online

150 database (updated on 2019-03-18) of the Center for Genomic Epidemiology (Larsen et al., 2012).

- 151 Phylogenetic analysis of the 108 Illumina and PacBio contigs was performed using ParSNP software 152 version 1.2 (Treangen et al., 2014) with default parameters using the A-I-1 strain as reference. The
- 153 iTOL software (Letunic and Bork, 2019) was used to visualize and edit the phylogenetic tree and
- 154 identify phylogenetic clusters (boodstrap of 100) inside the *P. aeruginosa* urinary population.

155 Illumina reads were aligned against every PacBio reference sequences using Snippy software version

156 4.4.0 (available on <u>https://github.com/tseemann/snippy/</u>). Clone type SNPs (ctSNPs), bounded by at

- 157 least 50 exact base-pair matches on both sides, were extracted from the alignments using a custom
- script. Isolates were considered to belong to different clone types when more than 6 000 ctSNPs were
- 159 found between their genomes (Marvig et al., 2015b).
- PlasmidFinder 2.1, available on the Center for Genomic Epidemiology database
 (<u>https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/</u>) was used to identify plasmid in genome sequences.

162

163 **2.5 SNPs analysis**

164 For each patient, SNPs were identified using Snippy software, by mapping Illumina reads to their

165 corresponding PacBio reference sequence. SNPs analysis was manually curated. When SNPs were

- 166 found in all the isolates sequenced by Illumina, they were considered specific to their common PacBio
- 167 reference sequence even though we cannot exclude that some were in fact artifacts due to the use of
- distinct sequencing approaches (PacBio vs Illumina). Snippy called the SnpEff software (Cingolani et

al., 2012) to annotate and predict the effect of each mutation. To identify the corresponding PAO1

- 170 locus tags, gene sequences from each PacBio reference genome were blasted against all PAO1 gene
- 171 sequences retrieved from <u>https://www.pseudomonas.com/</u>. Gene sequences that with no blast hit
- against PAO1 were classified as "hypothetical, unclassified, unknown". Genes where SNPs occurred
- 173 were classified into functional categories using PseudoCap available on the Pseudomonas Genome
- 174 Database (<u>https://www.pseudomonas.com/</u>). SNPs were classified as low (e.g. synonymous
- 175 mutations), moderate (e.g. missense mutations), and high effect (e.g. stop gained). SNPs that were not
- identified in early isolates (collected from the first urine sample for each patient) but present in at least
- 177 2 of late isolates were further described as "over time SNPs".
- 178 The core alignments produced by Snippy software for each patient were used to infer within-host
- 179 phylogenies: Neighbor Joining trees were produced using MEGA version X (Kumar et al., 2018), with
- 180 a Tamura Nei evolutionary model, rate heterogeneity following a Gamma distribution (parameter = 1),
- 181 and complete deletion of gaps and missing data.182
- 183 **2.6** Characterization of genomic deletions
- 184 Genomic deletions were visualised using CGView software (Stothard and Wishart, 2005), based on 185 the core alignments produced by Snippy. Deletions were also identified using KMA software version 186 1.2.12 (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/kma.git), with Illumina reads as query and the CDS 187 identified by pgap from their corresponding PacBio reference genome as database. To identify the 188 corresponding PAO1 locus tags, gene sequences from each PacBio reference genome were blasted 189 against all PAO1 gene sequences retrieved from https://www.pseudomonas.com/. Gene sequences that with no blast hit against PAO1 were classified as "hypothetical, unclassified, unknown". The deleted 190 191 genes were classified into functional categories using PseudoCap available on the Pseudomonas 192 Genome Database (https://www.pseudomonas.com/).
- 193 Genomic deletions were confirmed by PCR amplification. Briefly, genomic DNA was extracted using
- the InstaGeneTM Matrix kit (Bio-Rad) following the manufacturer's recommendations. PCRs were then
- 195 performed on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) in a final
- 196 volume of 25 µL containing 12.5 µL GoTaq® Green Master Mix (Promega, Charbonnières-Les-Bains,
- 197 France), 0.50 mM of each primer (**Table S1**) and 5 μ L of DNA. In each case, three primer pairs were
- used: two that bordered each side of the potentially deleted fragment and allowed the amplification for
- 199 isolates without genomic deletion, and one outside the deleted region, which allowed the amplification
- for isolates with genomic deletion. Two genomes without deletion (the intra-patient reference [X-I-1] and when possible, an isolate collected from the last urine sample) obtained from the same patient were
- 201 and when possible, an isolate collected from the last urine sample) obtained from the same patient were 202 used as a control.
- 203

204 2.7 Biofilm formation assay

- 205 Biofilm formation was assessed by a crystal violet staining assay as previously described (O'Toole, 206 2011) with minor modifications. Briefly, strains were grown overnight in trypticase soja broth (Thermo 207 Scientific, Les Ulis, France) supplemented with 1% glucose (w/v) (VWR, Leuven, Belgium) (Brooks 208 and Keevil, 1997). Overnight cultures were adjusted to an optical density at 600_{nm} (OD_{600nm}) of 0.01. 209 In a 96-well plastic microtiter plate (Thermo Scientific, Illkirch Graffenstaden, France), 100 µL of the 210 standardized samples were inoculated per well in triplicate. After 24h of static incubation at 37°C, 211 supernatants were removed, and the cells that remained attached to the microtiter wells were washed 212 twice with water by submersion. Cells were stained with 125 µL of an aqueous solution of 0.1% crystal 213 violet. After 15 min of incubation at room temperature, the plate was rinsed thrice with water by 214 submersion and dried for 2h. Cells were washed and resuspended in 50% (v/v) ethanol. OD_{590nm} of the 215 resuspended biofilm was determined and normalized to the OD_{600nm} of the corresponding planktonic 216 cells. All experiments were performed at least three times. The P. aeruginosa strain PA14 was used as a positive control and fresh medium as a negative control for each experiment. All data were expressed 217 218 as percent of biofilm formation relative to the positive control. Isolates forming less than 50% of
 - In formation relative to the positive control. Isolates forming less than 50% of

219 biofilm compared to PA14 were considered as low biofilm-producers, whereas isolates forming more

than 50% were considered as high biofilm-producers. Statistical analyses were performed by Kruskal-

- 221 Wallis test on $\mathbb{R}^{\mathbb{C}}$ software (v.3.5.1).
- 222

223 2.8 Fitness assays

224 Growth curves were performed in two distinct media: trypticase soja broth, and artificial urine medium 225 (AUM) according to Brooks and Keevil' protocol (Brooks and Keevil 1997) with minor modifications. Briefly, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES buffer) at 100 mM was added to the previously 226 227 described AUM in order to limit precipitates formation. Overnight cultures were adjusted to an OD_{600nm} 228 of 0.01. In a 96-well plastic microtiter plate, 200 µL of standardized samples were inoculated per well 229 in triplicate. The plate was placed inside a humidity cassette and incubated at 37°C for 24h under continuous double-orbital shaking (108 rpm) into the Spark® multimode microplate reader (Tecan, 230 231 Männedorf, Switzerland). OD_{600nm} was measured every 15 minutes. All experiments were performed 232 at least three times. The P. aeruginosa strain PA14 was used as an internal control and fresh medium 233 as a negative control for each experiment. Statistical analyses were performed by Kruskal-Wallis test 234 on R[©] software (v.3.5.1). The generation time ratio was defined for a given patient as the mean 235 generation time of isolates with genomic deletion on the mean generation time of isolates without one.

236

230

238 3 Results

239 3.1 Clinical data

240 During a 27-months period, seven hospitalized patients (A to G) with more than one urine sample 241 positive to *P. aeruginosa* were included in this study (**Figure 1**).

Chronic asymptomatic bacteriuria (AB) was observed for two patients (B and D) while chronic UTI
was observed for one patient (C). A switch from UTI to AB (patients A and E), from AB to UTI (patient
F) or successive switches from UTI and AB (patient G) were identified (**Table 1**). Of note, four patients
(B, C, F, and G) required long term urinary catheterization. Six patients had urinary disorders, including
benign prostate hypertrophy (C, D, G), urinary tract diversion (B, F), and kidney transplant (E). All

- 247 patients received at least one antibiotic treatment during the 6 months before urine collection, and 5 of
- them (A, B, C, E, and G) also received antibiotics in the interval of their urine samples (Table 1, Figure
 249 2A, Table S2).

250

251 **3.2** Antimicrobial resistance profiles

Isolates from the first urine sample exhibited a non-MDR phenotype for 4 patients (C, E, F, G), a MDR
phenotype for one patient (D), and a XDR phenotype for one patient (B). Within-sample diversity was
observed between isolates collected from patient A (4 MDR-isolates and one XDR) (Figure 2B).

Over time, the rate of antimicrobial resistance was similar for isolates of 2 patients (B, E) while it decreased for patient F, and increased for patients C and G (**Figure 2B**). Within-sample diversity of antimicrobial resistance profiles increased over time for 3 patients (A, D, G) (**Figure 2B**, **Supplementary Table S3**). No plasmid that could explain the acquisition of these resistance profiles have been identified in the genome sequences.

Surprisingly, no strict association was identified between antimicrobial resistance (**Figure 2B**) and previous antibiotic therapy (**Figure 2A**). Indeed, resistance to a given group of antibiotics was not systematically associated with previous antimicrobial therapy by one molecule of that group, suggesting acquisition of cross-resistance. Similarly, the increase of antimicrobial resistance of late isolates was not completely explained by antibiotic treatments during the period between urine samples.

266

267 **3.3** Genotyping and phylogeny of *P. aeruginosa* urinary population

- 268 Sequencing data are presented in **Supplementary Table S4**. The number of predicted genes per 269 genome sequenced by PacBio and annotated with PGAP ranged from 5,991 to 6,886.
- 270 In silico MLST analysis performed for the 108 urinary isolates revealed six sequence types (STs):
- 271 ST111, ST232, ST235, ST308, ST633, and ST3227. All isolates from a given patient, within a given
- sample but also over time, belonged to the same ST. Two patients (D and E) had isolates with the same
- ST (ST308). The phylogenetic analysis of the 108 core genomes (draft assemblies) led to the identification of six clusters that were congruent with the 6 STs identified (**Supplementary Figure**
- 275 **S1A**).
- 276 ctSNPs analysis led to the identification of 6 clone types, in accordance with the STs identified. The 277 average number of ctSNPs between isolates from a given patient was 7 (from 0 to 123) while it was 278 26,242 between patients (from 412 to 33,638) (Table 2). Of note, ST308 genomes belonged to a single 279 clone type (number of ctSNPs between patients D and E from 412 to 1,212), even though isolates were 280 collected from distinct patients. However, there was no clinical support for a cross infection between 281 patients D and E, since they were hospitalized in separate units at distinct times and were not 282 epidemiologically linked. Sequences sampled from each patient formed two distinct and well supported 283 phylogenetic clusters (Supplementary Figure S1B).
- 284

285 **3.4 Within-host evolution by SNPs**

- To characterize over-time evolution of within-host single-clone types, we investigated all SNPs identified for each isolates, depending on the time of urine sampling (**Supplementary Table S5**). For the seven patients, the mean number of SNPs was higher for the late isolates (8.6 ± 25) than for the isolates collected from the first urine sample (0.8 ± 1). The mutation rate ranged from 0 to 126 SNPs per genome per year (**Table 3**).
- 291 D-isolates had the highest numbers of SNPs, with an average of 2 SNPs per isolate in the first urine 292 sample, increasing to 90 in the second one (Table 3). Phylogenetic analysis of the core-genome 293 sequences sampled from this patient revealed distinct sublineages in the second urine sample, 294 consistent with the high number of SNPs observed (Figure 3). Indeed, one late isolate (D-II-1) was 295 phylogenetically related to the early isolates, and did not share any SNP with the other four late isolates 296 that clustered separately. Interestingly, no mutation was detected in DNA mismatch repair genes (like 297 mutS or mutL) but 2 SNPs were identified in genes involved in DNA replication, recombination, 298 modification and repair (a missense SNP, Asp559Asn, in uvrA, and a nonsense SNP at position 309/530 299 in the gene homologous of PA1405 at locus tag pgaptmp 005788).
- 300
- To identify genetic mutations that could be involved in phenotypic adaptation, we focused on over time SNPs (i.e. SNPs that were not identified in early isolates but present in at least 2 of late isolates) with
- 303 moderate (non-synonymous mutations) or high (stop gained) effect.
- None was detected in isolates collected from three patients (A, C, and E), while 2 to 79 over time SNPs
- 305 were identified for the other patients (B, D, F and G). No pathoadaptive genes reflecting convergent
- 306 evolution by these SNPs were identified for the isolates collected from the four patients. However,
- 307 SNPs preferentially occurred in genes encoding transcriptional regulators or involved in two 308 component systems (**Table 4**). However, no pathoadaptive genes reflecting convergent evolution by 309 SNPs was identified between isolates collected from distinct patients.
- 310 SNPs were identified in genes involved in virulence for isolates collected from patient D, F and G. For
- 311 D-isolates, 8 SNPs were identified in genes involved in motility and adherence (*fleS, fimT*), in type III
- and VI secretion systems (exsA [nonsense SNP], icmF1, hsiG3), in ferric uptake regulator (FUR)
- regulon (PA2094 and PA2402), or in stringent response (antitoxin *higA*). For F-isolates, 3 SNPs were
- 314 identified in genes involved in alginate biosynthesis or alginate regulation and biofilm formation (*algG*,
- 315 *algB*, and *mucA* [nonsense SNP]). Finally, one SNP was observed in the *fecI* sigma factor of the FUR
- 316 regulon in G-isolates.

317 Of note, SNP occurring in genes involved in antimicrobial resistance were only identified for D-isolates

318 (mexS). 319

320 3.5 Within-host evolution by genomic deletion

For three patients (A, D, and F), at least two of the late isolates had a smaller genome size than isolates 321 collected from the first urine sample (Supplementary Table S6), as shown by the read mapping on 322 323 the intra-patient reference sequence (Figure 4). Deletions represented up to 5% of the size of the reference genome for A- isolates, and about 1% for D- and F- isolates. All these genomic deletions 324

- were experimentally confirmed by PCR (Supplementary Table S1). 325
- 326 The largest genomic deletion (361 kbp) was observed in two late A- isolates (A-III-3 and -5), and led to the loss of 375 coding protein sequences (CDS). Genomic deletions of 35 kbp (46 CDS) and 101 327 kbp (97 CDS) and were observed for for D-II-2 to D-II-5 isolates and F-II-1 to F-II-5 isolates, 328 329 respectively. The deleted fragment of D- and F-isolates was immediately bordered by direct repeats
- (DR). For the F-isolates, the 1677 bp DR sequence corresponded to an insertion sequence (IS) that 330
- belongs to the IS1182 transposase family. Interestingly, the same IS was found at seven positions in 331
- 332 the F-I-1 genome. Furthermore, the deletions in A- and D-isolates led to the loss of 11 and 19 phage
- 333 related CDS, respectively.
- 334 For A- and F-isolates, 70 deleted CDS were common (homologous to PA1965 to PA2034 genes),
- suggesting a convergent evolution (Table 5). This region included genes involved in antimicrobial 335

resistance (mexX/Y/Z genes), regulatory systems (transcriptional regulators or two component 336

systems), carbon compound catabolism (liu, exa), and the genes hmgA (encoding a homogentisate 1,2-337

- dioxygenase) and galU (encoding an UDP-glucose phosphoylase involved in lipopolysaccharide 338
- 339 biosynthesis) (Lopez-Causapé 2018, Wardell 2019, Cabot 2016). Interestingly, isolates with the hmgA 340 deletion produced a red pigment (pyomelanin) when they were grown 24h on TSA (data not shown),
- as previously reported (Cabot et al., 2016). 341
- Morever, in A-isolates, the deleted region contained genes encoding EAL domain-containing proteins, 342
- which are involved in c-di-GMP degradation (a second messenger involved in biofilm formation), and 343
- 344 genes involved in virulence (hcnABC, encoding an hydrogen cyanide synthase; the effector exoY of the
- 345 type III secretion system; and cupA1 to cupA5, involved in fimbriae synthesis). Of note, F-isolates with
- *mucA* deletion (an anti-sigma factor of the algU gene involved in alginate biosynthesis) was deleted, 346
- isolates presented a mucoid morphotype after 48h of culture (data not shown). 347 348

349 **3.6** Phenotypic analyses

Fitness and biofilm formation assays were performed for A-, D-, and F-isolates (n = 35 isolates) for 350 351 which genomic deletions occurred over time.

- A- and D-isolates were low biofilm-producers (Figure 5). An increased biofilm formation was 352
- 353 identified for A- Δ isolates compared to the others (P < 0.05). In contrast, the ability of the D- Δ isolates
- 354 was reduced (P < 0.05). In parallel, early F-isolates were high biofilm-producers while deleted late F-355 isolates produced significantly less biofilm (P < 0.01).
- Isolates with a genomic deletion had a significant lower fitness in TSB broth (for D- and F-isolates) 356 357 and in AUM (for all patients) (Figure 6). The reverse trend was observed for A-isolates in TSB broth
- (P < 0.05). Interestingly, the generation time ratio (defined as the mean generation time of isolates with 358
- 359 genomic deletion on the mean generation time of isolates without one for a given patient) was near to
- 360 2 in AUM (1.7 for A-isolates, 2.3 for D-isolates and 1.9 for F-isolates). Thus, isolates with genomic
- 361 deletion grew about half as fast as isolates without a genomic deletion in AUM.
- 362
- 363

4 364 **Discussion**

365 P. aeruginosa is a major cause of healthcare associated UTI, characterized by frequent relapses

366 (Djordjevic et al., 2013; Gomila et al., 2018). Numerous studies explored mechanisms of *P. aeruginosa*

persistence during chronic pulmonary infections in CF patients (Caballero et al., 2015; Marvig et al.,
 2015b; Bianconi et al., 2018; Bartell et al., 2019), but little is known about its pathoadaptive adaptation

- in the urinary tract. To this end, up to five isolates of *P. aeruginosa* were collected in longitudinal urine
- 370 samples from 7 hospitalized patients.
- 371 All patients enrolled in our study were colonized or infected over time by a single clone type, well-
- 372 predicted by in silico MLST. Nevertheless, distinct sublineages have been identified in the second
- 373 urine sample collected from one patient (D), suggesting a progressive replacement of the naive initial
- *P. aeruginosa* population over time. This is consistent with longitudinal studies of CF infections, which
- 375 showed that chronic *P. aeruginosa* infections were often associated with diversification to distinct
- variants (Marvig et al., 2015b; Bianconi et al., 2018; Bartell et al., 2019). Even though our sampling
 period was shorter (488 days at most) than these studies (where inclusion could occurred nearly a
 decade apart), Bartell et *al.* pointed that rapid adaptation occur within 2-3 years timeline after
 colonization in CF patients (Bartell et al., 2019).
- 380

To our knowledge, this is the first comprehensive whole genome analysis of within-host evolution of *P. aeruginosa* in the urinary tract. It has highlighted the molecular mechanisms of its adaptation, which was mostly driven by two distinct mechanisms: SNPs and large genomic deletions.

385 SNPs analysis revealed that an average of less than 10 SNPs differentiated early from late isolates for 386 a given patient. The number of SNPs identified was much lower than that detected for isolates collected 387 during CF infections (up to 27,249 SNPs per strain in Bianconi et al.'s study) (Bianconi et al., 2018). 388 This is probably because we used here the intra-patient reference sequence to limit the phylogenetic 389 distance between isolates and the reference genome while CF studies usually use a reference sequence 390 (P. aeruginosa DK2 or PAO1) (Bianconi et al., 2018; Marvig et al., 2015b. Nevertheless, we cannot 391 exclude that the first urine sample of each patient enrolled here did not correspond to the first episode 392 of UTI or AB and therefore we could have underestimated within-host evolution.

393 However, in order to quantitatively compare evolution by SNPs over time, we have evaluated the 394 number of SNPs per genome per year. For most patients, the mean number of SNPs per genome per 395 year (ranging from 0 to 126) could have been higher than that previously described for chronic CF 396 infections (1-3) (Marvig et al., 2015a). Interestingly, the highest rate observed for one patient (126, 397 patient D) reached that of 89-106 identified for hypermutator strains (Marvig et al., 2015a). For this 398 patient, no SNP was identified in DNA mismatch repair genes (mutS and mutL) that often characterize 399 hypermutator strains (Colque et al., 2020), but two SNPs in genes involved in DNA replication, 400 recombination, modification and repair were identified, as previously described (Qin et al., 2018).

401 Over time SNPs with moderate or high effect were identified in four patients, all from urine samples 402 collected more than 100 days apart (B, D, F, G). In contrast to CF infections (Marvig et al., 2015b), no 403 pathoadaptive genes that could suggest a convergent evolution were identified. Nevertheless, SNPs in 404 genes encoding transcriptional regulators and two component systems were identified in three of the 405 four patients, suggesting that remodeling of regulatory networks might be important in *P. aeruginosa* 406 adaptation to the urinary tract. Similarly, 10 of the 52 pathoadaptive genes identified during a 407 longitudinal study in CF infections encoded transcriptional regulators (Marvig et al., 2015b).

408

409 In addition to mutations, and similarly to Bianconi et al. (Bianconi et al., 2018), we identified that 410 bacterial persistence could be associated with loss events. Indeed, genomic deletions were identified

411 in isolates collected from three of the seven patients studied (A, D, F) over up to 100 days apart. The

412 size of the genomic deletions observed in our study (35 to 361 kbp) was slightly smaller than those

413 previously reported during CF infections, which could reach up to 8% (525 kbp) of the genome (Rau414 et al., 2012).

- 415 Analysis of the deleted genes showed a convergent evolution on 70 CDS for two patients (A, F). Among them, deletion of the *hmgA* and *galU* genes have been previously reported *in vitro* (after 416 417 meropenem exposure) or in vivo (Cabot et al., 2016; Hocquet et al., 2016; Wardell et al., 2019). Deletion of *hmgA* resulted in pyomelanin hyperproduction, which was also phenotypically observed 418 419 for the isolates of our study that presented the deletion of this gene. The galU gene is involved in 420 polysaccharide biosynthesis, and its deleted mutant was shown to be devoid of O-antigen, and promoted persistence of *P. aeruginosa* in chronic lung infection by immune evasion (Rodríguez-Rojas 421 422 et al., 2009; Hocquet et al., 2016). Furthermore, as galU has previously been described as necessary 423 for phage adsorption, its deletion led to a phage resistance mechanism (Le et al., 2014).
- 425 for phage adsorption, its deletion fed to a phage resistance mechanism (Le et al., 2014).
 424 The convergent evolution in patients A and F led to the deletion of genes PA1965 to PA2034.
 425 Interestingly, this genomic area was previously described as subject to genomic deletion. In a study
- focused on six pyomelanin-producing mutants of P. aeruginosa (Hocquet et al., 2016), 46 genes in the 426 vicinity of *hmgA* (from PA1974 to PA2019) were deleted in all the pyomelanin-producing isolates. 427 428 Similarly, Wardell et al. (Wardell et al., 2019) identified large genomic deletions (from 225 kb up to 429 480 kb) that led to the loss of the PA2022 to PA2208 genes in 13 meropenem-resistant mutants. Thus, the deletion of genes in the vicinity of hmgA seems to provide an advantage for P. aeruginosa 430 431 adaptation to human host. Gene function analysis identified that convergent evolution by deletion 432 mostly affected genes involved in carbon compound catabolism, membrane proteins, and 433 transcriptional regulators. Reduction in the catabolic repertoire was previously described in clinical CF 434 isolates over time (La Rosa et al., 2019). In the same way, in an oxygen-limiting environment such as 435 urinary tract, P. aeruginosa could divert its energy sources from sugar-derived carbon sources to 436 denitrification or arginine fermentation (Tielen et al., 2013).
- 437

438 We then studied whether the large genomic deletions observed for some isolates had a phenotypic 439 impact. We first studied biofilm formation, since chronic colonization is known to be associated with a switch from planktonic to sessile lifestyle and biofilm formation (Olivares et al., 2019). In two 440 441 patients (A, D); who didn't undergo urine catheterization, all isolates – whether they had the genomic 442 deletion or not - were low-biofilm producers. These results were correlated with the observation made by Bartell et al. (Bartell et al., 2019) where biofilm formation didn't significantly correlate with 443 444 duration of colonization. Isolates with genomic deletion from the third patient (F), who had intermittent 445 self-catheterization, produced significantly less biofilm than isolates without deletion. This phenotypic observation was probably not explained by the function of the deleted genes as none were involved in 446 447 biofilm formation. However, the deleted isolates also presented SNPs in genes involved in alginate 448 biosynthesis and regulation (algG, algB, and mucA), which could be involved in the reduction of 449 biofilm production.

- 450 Next, we analyzed the fitness of our isolates in rich and artificial urine medium as several 451 pathoadaptative genes (involved in central metabolism or antimicrobial resistance) have been shown 452 to optimize pathogen fitness during CF infections (Marvig et al., 2015a). We showed that isolates with 453 genomic deletion presented a lower fitness than isolates without deletion, particularly in AUM. These 454 results are similar to those of Rodríguez-Rojas et al. (Rodríguez-Rojas et al., 2009), who identified that isolates with genomic deletion presented a lower fitness (during a 48h of co-infection with the wild-455 456 type strain in an acute respiratory model) that contribute to a decreased clearance and an increased 457 persistence of *P. aeruginosa* in chronic lung infections.
- 458

459 Numerous studies have showed that *P. aeruginosa* adaptation to pulmonary airway during chronic 460 infections was associated with mutations in genes involved in antimicrobial, like those of the MexAB-

461 OprM efflux pump (mexA, mexB, nalD) or genes involved in fluoroquinolones resistance (gyrA, gyrB)

462 (Marvig et al., 2015b; López-Causapé et al., 2018; Bartell et al., 2019; Colque et al., 2020). In contrast, 463 in our study, isolates from only one patient (D) harbored over time SNP in a gene involved in 464 antimicrobial resistance. This mutation in *mexS*, involved in regulation of the MexEF-OprN efflux 465 pump, was correlated with increased within-sample diversity in terms of antimicrobial resistance 466 profiles. In parallel, genomic deletions were associated for two patients (A, F) with the loss of the 467 mexX, mexY, mexZ genes (involved in the MexXY-OprM efflux pump and aminoglycosides resistance) 468 (López-Causapé et al., 2018), but they were correlated with phenotypic aminoglycoside-resistance for 469 only one patient. Thus, acquisition of antimicrobial resistance doesn't appear to provide a main 470 advantage for P. aeruginosa adaptation in the urinary tract. However, further genotypic analyses by 471 real-time reverse transcription-PCR would be needed to determine the level of expression of genes 472 potentially involved in antimicrobial resistance.

473

This study presented some limitations. First, a higher number of isolates per urine sample may be of interest to explore intra-host diversity and limit the risk of identifying over time SNPs that may have been present in isolates from the first sample not analyzed in this study. Second, using two separate methodologies for genome sequencing may have biased the identification of the SNPs. Nevertheless, this approach allowed the mapping of the genomes on an intra-patient genome reference that was sequenced by a long-read technology. Third, genomic analyses required the use of numerous successive bioinformatics tools, each with its own sensitivity and specificity.

481

482 Finally, all patients enrolled in our study were infected or colonized by a given clone type over time, 483 even though diversification could occur. P. aeruginosa adaptation to the urinary tract frequently 484 occurred by SNPs and/or deletion in genes encoding transcriptional regulators, two-component 485 systems, and carbon compound catabolism. Limitation of oxygen and nutrients in the urinary tract 486 could drive P. aeruginosa to adapt its metabolism in favour of non-carbon energy sources and then to 487 remodel its regulatory networks. Further metabolomic and phenotypic studies (such as biofilm 488 formation in artificial urine medium) would be of interest to identify the regulatory pathways used by 489 P. aeruginosa for adaptation to urinary conditions.

- 490
- 491

4925Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financialrelationships that could be construed as a potential conflict of interest.

495

496 **6** Author Contributions

497 Author contributions included conception and design (AC, SD, MPC, EJB), phenotypic experiments
498 (AC, MG, TF), genomic analyses (AC, ML) and interpretation of data (AC, ML, MG, FG, FA, SLH),
499 and manuscript preparation (AC, SD, MPC). All authors amended and approved the final version of
500 the manuscript.

501

502 **7** Acknowledgments

503 The authors would like to thank the "Centre Régional Informatique et d'Applications Numériques de 504 Normandie" for high-performance computing resources dedicated to our researches.

505

506 8 Ethics statements

507 According to the French regulation on observational database analyses, this study did not need specific 508 informed consent requirements; it was registered by the Directorate of Clinical Research and 509 Innovation of the Rouen University Hospital Centre under the number 2018/413/OB.

510

511 9 Supplementary Material

512 Supplementary information accompanies the manuscript.

513

514 **10 Data Availability Statement**

- 515 The datasets generated for this study can be found in the Bioproject: PRJNA656414
- 516 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/656414.

517

519 11 References

- Bartell, J. A., Sommer, L. M., Haagensen, J. A. J., Loch, A., Espinosa, R., Molin, S., et al. (2019).
 Evolutionary highways to persistent bacterial infection. *Nat. Commun.* 10, 629.
 doi:10.1038/s41467-019-08504-7.
- Bianconi, I., D'Arcangelo, S., Esposito, A., Benedet, M., Piffer, E., Dinnella, G., et al. (2018).
 Persistence and Microevolution of Pseudomonas aeruginosa in the Cystic Fibrosis Lung: A
 Single-Patient Longitudinal Genomic Study. *Front. Microbiol.* 9, 3242.
 doi:10.3389/fmicb.2018.03242.
- Brooks, T., and Keevil, C. W. (1997). A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens.
 Lett. Appl. Microbiol. 24, 203–206. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00378.x.
- Caballero, J. D., Clark, S. T., Coburn, B., Zhang, Y., Wang, P. W., Donaldson, S. L., et al. (2015).
 Selective Sweeps and Parallel Pathoadaptation Drive Pseudomonas aeruginosa Evolution in the Cystic Fibrosis Lung. *mBio* 6, e00981-15. doi:10.1128/mBio.00981-15.
- Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J., et al. (2016). Evolution of
 Pseudomonas aeruginosa Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation
 Rates. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 1767–1778. doi:10.1128/AAC.02676-15.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., et al. (2012). A program for
 annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly*(*Austin*) 6, 80–92. doi:10.4161/fly.19695.
- Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw
 reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* 19, 307.
 doi:10.1186/s12859-018-2336-6.
- 541 Colque, C. A., Albarracín Orio, A. G., Feliziani, S., Marvig, R. L., Tobares, A. R., Johansen, H. K.,
 542 et al. (2020). Hypermutator Pseudomonas aeruginosa Exploits Multiple Genetic Pathways To
 543 Develop Multidrug Resistance during Long-Term Infections in the Airways of Cystic Fibrosis
 544 Patients. Antimicrob. Agents Chemother. 64. doi:10.1128/AAC.02142-19.
- 545 Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., and Dowson, C. G. (2004). Development of a
 546 multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa.
 547 *J. Clin. Microbiol.* 42, 5644–5649. doi:10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
- 548 Djordjevic, Z., Folic, M. M., Zivic, Z., Markovic, V., and Jankovic, S. M. (2013). Nosocomial
 549 urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species:
 550 sensitivity to antibiotics and risk factors. *Am. J. Infect. Control* 41, 1182–1187.
 551 doi:10.1016/j.ajic.2013.02.018.
- Gomila, A., Carratalà, J., Eliakim-Raz, N., Shaw, E., Wiegand, I., Vallejo-Torres, L., et al. (2018).
 Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study. *Infect. Drug Resist.* 11, 2571–2581. doi:10.2147/IDR.S185753.
- Hocquet, D., Petitjean, M., Rohmer, L., Valot, B., Kulasekara, H. D., Bedel, E., et al. (2016).
 Pyomelanin-producing Pseudomonas aeruginosa selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environ. Microbiol.* 18, 3482–3493. doi:10.1111/1462-2920.13336.
- Hussain, M., Suliman, M., Ahmed, A., Altayb, H., and Elneima, E. (2017). Draft Genome Sequence
 of a Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strain Isolated from a Patient with a
 Urinary Tract Infection in Khartoum, Sudan. *Genome Announc.* 5.
- 563 doi:10.1128/genomeA.00203-17.
- Klockgether, J., and Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding Pseudomonas
 aeruginosa as a pathogen. *F1000Research* 6. doi:10.12688/f1000research.10506.1.

566 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular 567 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547–1549. 568 doi:10.1093/molbev/msy096. 569 La Rosa, R., Johansen, H. K., and Molin, S. (2019). Adapting to the Airways: Metabolic 570 Requirements of Pseudomonas aeruginosa during the Infection of Cystic Fibrosis Patients. Metabolites 9. doi:10.3390/metabo9100234. 571 572 Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, 573 A., Bermúdez Sanjurjo, J. R., et al. (2017). Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. PLoS ONE 12. 574 575 doi:10.1371/journal.pone.0178178. 576 Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., et al. (2012). 577 Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J. Clin. Microbiol. 50, 578 1355-1361. doi:10.1128/JCM.06094-11. 579 Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., et al. (2014). Chromosomal DNA deletion confers 580 phage resistance to Pseudomonas aeruginosa. Sci. Rep. 4, 4738. doi:10.1038/srep04738. 581 Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 47, W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239. 582 583 López-Causapé, C., Cabot, G., Del Barrio-Tofiño, E., and Oliver, A. (2018). The Versatile 584 Mutational Resistome of Pseudomonas aeruginosa. Front. Microbiol. 9, 685. 585 doi:10.3389/fmicb.2018.00685. 586 Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. 587 (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an 588 international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. 589 Microbiol. Infect. 18, 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. 590 Marvig, R. L., Sommer, L. M., Jelsbak, L., Molin, S., and Johansen, H. K. (2015a). Evolutionary insight from whole-genome sequencing of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis 591 592 patients. Future Microbiol. 10, 599-611. doi:10.2217/fmb.15.3. 593 Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S., and Johansen, H. K. (2015b). Convergent evolution and 594 adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. Nat. Genet. 47, 595 57-64. doi:10.1038/ng.3148. 596 Nicolle, L. E. (2014). Catheter associated urinary tract infections. Antimicrob. Resist. Infect. Control 597 3, 23. doi:10.1186/2047-2994-3-23. 598 Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., and Jehl, F. (2019). Clinical 599 Impact of Antibiotics for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections. 600 Front. Microbiol. 10, 2894. doi:10.3389/fmicb.2019.02894. 601 O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. J. Vis. Exp., 2437. 602 doi:10.3791/2437. 603 Pestrak, M. J., Chaney, S. B., Eggleston, H. C., Dellos-Nolan, S., Dixit, S., Mathew-Steiner, S. S., et 604 al. (2018). Pseudomonas aeruginosa rugose small-colony variants evade host clearance, are 605 hyper-inflammatory, and persist in multiple host environments. PLOS Pathog. 14, e1006842. 606 doi:10.1371/journal.ppat.1006842. 607 Qin, X., Zhou, C., Zerr, D. M., Adler, A., Addetia, A., Yuan, S., et al. (2018). Heterogeneous 608 Antimicrobial Susceptibility Characteristics in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic 609 Fibrosis Patients. mSphere 3. doi:10.1128/mSphere.00615-17. 610 Rau, M. H., Marvig, R. L., Ehrlich, G. D., Molin, S., and Jelsbak, L. (2012). Deletion and acquisition 611 of genomic content during early stage adaptation of Pseudomonas aeruginosa to a human host 612 environment. Environ. Microbiol. 14, 2200-2211. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02795.x. 613 Rodríguez-Rojas, A., Mena, A., Martín, S., Borrell, N., Oliver, A., and Blázquez, J. (2009). 614 Inactivation of the hmgA gene of Pseudomonas aeruginosa leads to pyomelanin

- 615 hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. 616 Microbiol. Read. Engl. 155, 1050-1057. doi:10.1099/mic.0.024745-0. 617 Soares, A., Alexandre, K., and Etienne, M. (2020). Tolerance and Persistence of Pseudomonas 618 aeruginosa in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies 619 and Therapeutic Perspectives. Front. Microbiol. 11. doi:10.3389/fmicb.2020.02057. 620 Stothard, P., and Wishart, D. S. (2005). Circular genome visualization and exploration using 621 CGView. Bioinformatics 21, 537-539. doi:10.1093/bioinformatics/bti054. 622 Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., et al. 623 (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res. 44, 6614–6624. 624 doi:10.1093/nar/gkw569. 625 Tielen, P., Rosin, N., Meyer, A.-K., Dohnt, K., Haddad, I., Jänsch, L., et al. (2013). Regulatory and 626 Metabolic Networks for the Adaptation of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Urinary 627 Tract-Like Conditions. PLOS ONE 8, e71845. doi:10.1371/journal.pone.0071845. 628 Tielen, P., Wibberg, D., Blom, J., Rosin, N., Meyer, A.-K., Bunk, B., et al. (2014). Genome 629 Sequence of the Small-Colony Variant Pseudomonas aeruginosa MH27, Isolated from a 630 Chronic Urethral Catheter Infection. Genome Announc 2, e01174-13. 631 doi:10.1128/genomeA.01174-13. Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., and Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid 632 633 core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. 634 Genome Biol. 15, 524. doi:10.1186/s13059-014-0524-x. 635 Vorhölter, F.-J., Tielen, P., Wibberg, D., Narten, M., Schobert, M., Tüpker, R., et al. (2015). Genome 636 Sequence of the Urethral Catheter Isolate Pseudomonas aeruginosa MH19. Genome Announc 637 3, e00115-15. doi:10.1128/genomeA.00115-15. 638 Wardell, S. J. T., Rehman, A., Martin, L. W., Winstanley, C., Patrick, W. M., and Lamont, I. L. 639 (2019). A Large-Scale Whole-Genome Comparison Shows that Experimental Evolution in 640 Response to Antibiotics Predicts Changes in Naturally Evolved Clinical Pseudomonas 641 aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 63. doi:10.1128/AAC.01619-19. 642 Wibberg, D., Tielen, P., Blom, J., Rosin, N., Schobert, M., Tüpker, R., et al. (2014). Genome 643 Sequence of the Acute Urethral Catheter Isolate Pseudomonas aeruginosa MH38. Genome 644 Announc. 2. doi:10.1128/genomeA.00161-14. 645 Wibberg, D., Tielen, P., Narten, M., Schobert, M., Blom, J., Schatschneider, S., et al. (2015). 646 Genome Sequence of the Urethral Isolate Pseudomonas aeruginosa RN21. Genome Announc 647 3, e00788-15. doi:10.1128/genomeA.00788-15. 648 Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M. A. (2016). Pseudomonas aeruginosa Evolutionary 649 Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. Trends Microbiol. 650 24, 327-337. doi:10.1016/j.tim.2016.01.008. 651
- 652

653 Figure 1. Flowchart of the *P. aeruginosa* collection studied.

654 Patients (A to G) are illustrated by black figures. Urine cultures (roman numbers) collected from each

- patient are represented by black circles. Up to five isolates (red or green dots; arabic numbers) were
- 656 collected from each urine culture. Isolates with genomic deletions are indicated by red triangles. Only
- 3 isolates were collected from the last urine sample for patient G because of a low bacteriuria.
- As an example, nomenclature of the isolates collected from each urine sample is represented for patient A.
- 660

661 Figure 2. Antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* urinary isolates.

662 A. Previous antibiotic therapy received by patients; in the previous 6 months before the first urine 663 culture or in the laps of time between two urine cultures.

B. Cumulative antimicrobial resistance of isolates per urine culture. Cumulative resistance represents

the sum of the percentages of resistance to each antibiotic class. It can reach 1400% when all the

isolates are resistant to the 14 antibiotics tested. As an example, when 2 of the 5 isolates collected

from a given urine sample were resistant to ticarcillin, then the rate of resistance was 20%. The

numbers below the histograms represent the number of isolates with non-MDR, MDR or XDR

669 resistance profiles within a given urine sample

670 671

672 Figure 3. Phylogenetic analysis of the isolates collected from the patient D.

The core-genome alignment produced by snippy was used for phylogenetic inference using MEGA

- software. The phylogenetic tree was rooted on the PacBio reference sequence D-I-1. Isolates with
 genomic deletion are identified by a red triangle. Boodstrap values are indicated when >70.
- 676 677

678 Figure 4. Genomic deletions identified in late isolates collected from three patients (A, D, F).

679 Genome coverage is represented for three patients (A, D, and F) according to Illumina read mapping 680 by snippy on their corresponding PacBio reference sequence. Green, blue and purple colors indicate 681 that the isolates are from sample I, II and III, respectively. Samples and genomic regions were large 682 deletions occurred in late isolates are framed by red rectangles.

683

Figure 5. Mean biofilm formation of 35 *P. aeruginosa* urinary isolates collected from 3 patients (A, D and F) compared to PA14.

- 686 Biofilm formation was evaluated by crystal violet in microtiter plates and was compared between 687 isolates with genomic deletions $(-\Delta)$ and without genomic deletion for each patients.
- 688 A- Δ : A-III-3, and A-III-5 isolates; D- Δ : D-II-2 to D-II-5 isolates; F- Δ : F-II-1 to F-II-5 isolates.
- 689 Significance was identified as P < 0.05 (*) or P < 0.01 (**) by Kruskal-Wallis test.
- 690

Figure 6. Generation time of 35 *P. aeruginosa* urinary isolates collected from 3 patients (A, D and F) compared to PA14.

- 693 Generation time (G) (min) in A. TSB broth and B. artificial urine medium of isolates with $(-\Delta)$ and 694 without genomic deletion
- 695 A- Δ : A-III-3, and A-III-5 isolates; D- Δ : D-II-2 to D-II-5 isolates; F- Δ : F-II-1 to F-II-5 isolates.
- 696 Significance was identified as P < 0.05 (*) or P < 0.01 (**) by Kruskal-Wallis test.
- 697

699 Table 1. Clinical context associated with the 108 *P. aeruginosa* urinary isolates studied

700 Letters (A-G) identify patients. Roman numerals (I-V) correspond to urine sample numbers in the series collected from a given patient.^a

- 701 Urinary comorbidity includes neurogenic bladder, benign prostate hypertrophy, urinary tract diversion, and renal transplant. ^b
- 702 Immunocompromised conditions include immunodepression (like AIDS, lymphoma, leukemia) or immunosuppressor treatment. ^c Days (D)
- between a given urine sample and the first one. * Indicates urinary catheterization
- 704 Y: yes; N: no; UTI: urinary tract infection; AB: asymptomatic bacteriuria

7	0	5

Patient		Α	В	С	D	E	F	G
Age range (years)		70-74	65-69	80-84	65-69	60-64	15-19	75-79
Urinary comorbidity ^a		Ν	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Immunocompromised conditions ^b)	Y	Y	Ν	Y	Y	Ν	N
Clinical context [time] °					-			
	Urine sample I	UTI [D ₀]	$AB* [D_0]$	UTI * [D ₀]	AB $[D_0]$	UTI * [D ₀]	AB* [D ₀]	UTI * [D ₀]
	Urine sample II	UTI [D ₁₄]	AB* [D ₃₃]	UTI* [D ₄₈]	AB [D ₂₅₉]	AB [D ₂₈]	UTI * [D ₁₁₃]	AB* [D ₄₆]
	Urine sample III	AB [D ₈₂]	AB* [D ₂₉₆]			AB [D ₇₀]		AB* [D ₉₀]
	Urine sample IV		AB* [D ₃₆₂]			AB [D ₈₁]		UTI * [D ₂₇₁]
	Urine sample V		AB* [D ₄₈₈]					

709 Table 2. Clone types based on ctSNP counts

Г

- Illumina reads (lines) were mapped to PacBio reference sequences (columns) using Snippy software. 710
- The number of SNPs bounded by at least 50 exact base-pair matches on both sides (ctSNPs) is shown 711
- for each Illumina/PacBio sequence pair. A shade of color from yellow to green, indicates the level of 712
- 713 ctSNPs count; pairs of sequences that belong to a single clone type (less than 6000 ctSNPs) are shown in yellow.
- 714
- 715 716

	Isolates sequenced by PacBio							
	A-I-1	B-I-1	C-I-1	D-I-1	E-I-1	F-I-1	G-I-1	
Isolates sequenced by A-I-2	3	32 025	18 281	33 121	33 363	21 143	18 960	
Illumina A-I-3	3	31 952	18 268	33 044	33 265	21 111	18 934	
A-I-4	3	31 989	18 264	33 096	33 304	21 128	18 956	
A-I-5	4	31 936	18 250	33 033	33 250	21 105	18 921	
A-II-1	3	31 821	18 207	32 903	33 111	21 037	18 870	
A-II-2	4	32 052	18 299	33 179	33 422	21 180	18 981	
A-II-3	3	32 087	18 314	33 228	33 481	21 184	18 997	
A-II-4	4	31 985	18 276	33 091	33 328	21 134	18 952	
A-II-5	3	32 054	18 301	33 164	33 403	21 167	18 986	
A-III-1	3	32 030	18 299	33 158	33 389	21 169	18 978	
A-III-2	3	32 064	18 300	33 183	33 417	21 168	18 978	
A-III-3	3	30 245	17 369	31 448	31 688	20 207	17 986	
A-III-4	4	32 011	18 287	33 127	33 364	21 145	18 963	
A-III-5	5	30 308	17 399	31 512	31 747	20 233	18 015	
B-I-2	31 882	2	30 995	23 135	22 790	31 197	31 335	
B-I-3	32 034	0	31 067	23 196	22 856	31 268	31 407	
B-I-4	32 055	3	31 086	23 219	22 875	31 288	31 430	
B-I-5	31 910	2	31 011	23 140	22 792	31 201	31 351	
B-II-1	32 057	2	31 083	23 205	22 856	31 279	31 421	
B-II-2	32 039	3	31 074	23 205	22 860	31 286	31 420	
B-II-3	30 981	3	30 252	22 581	22 271	30 484	30 593	
B-II-4	31 978	3	31 043	23 174	22 833	31 258	31 391	
B-II-5	31 955	3	31 034	23 162	22 815	31 241	31 373	
B-III-1	32 032	6	31 086	23 211	22 865	31 278	31 414	
B-III-2	31 927	5	31 012	23 143	22 806	31 214	31 365	
B-III-3	31 989	6	31 008	23 184	22 842	31 230	31 386	
B-III-4	31 914	5	31 013	23 144	22 797	31 214	31 347	
B-III-5	31 988	7	31 027	23 182	22 839	31 229	31 373	
B-IV-1	31 956	5	31 037	23 164	22 821	31 235	31 376	
B-IV-2	31 968	7	30 996	23 150	22 803	31 225	31 375	
B-IV-3	32 089	6	31 070	23 230	22 886	31 284	31 444	
B-IV-4	31 971	6	31 008	23 162	22 821	31 234	31 380	
B-IV-5	31 901	6	30 964	23 135	22 796	31 182	31 349	
B-V-1	32 015	6	31 067	23 196	22 844	31 266	31 405	

Pseudomonas aeruginosa adaptation urinary tract

-							
B-V-2	31 921	5	31 025	23 143	22 795	31 221	31 366
B-V-3	31 851	5	30 966	23 116	22 775	31 168	31 310
B-V-4	31 976	5	31 039	23 181	22 842	31 249	31 395
B-V-5	31 974	5	31 048	23 171	22 829	31 248	31 387
C-I-2	18 261	31 018	0	31 431	31 411	19 909	17 316
C-I-3	18 274	31 012	0	31 437	31 420	19 923	17 313
C-I-4	18 300	31 057	0	31 484	31 461	19 932	17 343
C-I-5	18 302	31 063	1	31 491	31 469	19 938	17 344
C-II-1	18 284	31 053	1	31 456	31 445	19 932	17 325
C-II-2	18 298	31 071	1	31 495	31 470	19 938	17 356
C-II-3	18 289	31 055	1	31 480	31 465	19 939	17 347
C-II-4	18 329	31 112	2	31 535	31 518	19 957	17 372
C-II-5	18 285	31 064	1	31 480	31 465	19 939	17 326
D-I-2	33 068	23 159	31 567	3	414	31 139	32 102
D-I-3	33 080	23 166	31 572	6	412	31 140	32 111
D-I-4	33 096	23 173	31 597	4	414	31 162	32 128
D-I-5	33 011	23 092	31 535	6	414	31 103	32 063
D-II-1	33 133	23 219	31 586	8	422	31 150	32 144
D-II-2	33 322	23 304	31 613	122	1 193	31 218	32 278
D-II-3	33 261	23 239	31 595	121	1 186	31 205	32 246
D-II-4	33 264	23 234	31 588	69	1 158	31 182	32 236
D-II-5	33 445	23 347	31 663	123	1 212	31 267	32 328
E-I-2	33 542	23 023	31 576	1 116	2	31 500	32 470
E-I-3	33 586	23 039	31 600	1 116	1	31 528	32 495
E-I-4	33 513	23 001	31 575	1 113	2	31 512	32 471
E-I-5	33 596	23 056	31 592	1 118	2	31 533	32 500
E-II-1	33 638	23 086	31 614	1 123	1	31 554	32 506
E-II-2	33 386	22 933	31 499	1 091	0	31 422	32 384
E-II-3	33 633	23 105	31 611	1 126	1	31 562	32 506
E-II-4	33 631	23 083	31 609	1 120	1	31 551	32 518
E-II-5	33 438	22 972	31 520	1 100	1	31 468	32 411
E-III-1	33 550	23 032	31 582	1 110	1	31 515	32 473
E-III-2	33 441	22 956	31 527	1 097	1	31 443	32 415
E-III-3	33 521	23 029	31 588	1 1 1 1	2	31 521	32 473
E-III-4	33 562	23 046	31 591	1 113	1	31 520	32 486
E-III-5	33 436	22 973	31 542	1 106	1	31 468	32 437
E-IV-1	33 453	22 977	31 536	1 104	1	31 476	32 432
E-IV-2	33 563	23 046	31 585	1 117	1	31 522	32 481
E-1V-3	33 541	23 039	31 588	1 116	1	31 515	32 485
E-1V-4	33 625	23 087	31 601	1 127	2	31 555	32 510
E-1V-5	33 446	22 988	31 538	1 098	1	31 467	32 428
F-I-2	21 150	31 234	19 923	31 232	31 541	0	20 367
F-I-3	21 187	31 254	19 939	31 255	31 562	0	20 391

Pseudomonas aeruginosa adaptation urinary tract

							-
F-I-4	21 170	31 254	19 936	31 250	31 557	0	20 392
F-I-5	21 190	31 255	19 947	31 264	31 575	0	20 401
F-II-1	20 779	30 694	19 504	30 681	30 980	6	20 004
F-II-2	20 868	30 795	19 551	30 776	31 098	7	20 089
F-II-3	20 844	30 757	19 536	30 755	31 062	8	20 046
F-II-4	20 832	30 754	19 532	30 746	31 052	9	20 058
F-II-5	20 824	30 735	19 525	30 725	31 033	7	20 038
G-I-2	18 936	31 372	17 316	32 209	32 405	20 341	0
G-I-3	18 948	31 389	17 339	32 215	32 412	20 366	0
G-I-4	18 977	31 435	17 355	32 262	32 458	20 386	1
G-I-5	18 993	31 450	17 365	32 272	32 469	20 406	1
G-II-1	18 902	31 331	17 306	32 158	32 354	20 324	0
G-II-2	18 975	31 427	17 351	32 253	32 450	20 384	0
G-II-3	18 951	31 412	17 343	32 233	32 427	20 375	0
G-II-4	18 935	31 356	17 316	32 190	32 385	20 333	0
G-II-5	18 986	31 429	17 361	32 263	32 463	20 380	0
G-III-1	18 963	31 412	17 348	32 249	32 445	20 372	0
G-III-2	18 908	31 353	17 309	32 171	32 363	20 324	0
G-III-3	18 942	31 395	17 330	32 209	32 396	20 356	0
G-III-4	18 933	31 365	17 313	32 195	32 391	20 339	0
G-III-5	18 935	31 374	17 312	32 199	32 389	20 344	0
G-IV-1	18 951	31 395	17 334	32 228	32 421	20 362	2
G-IV-2	18 961	31 403	17 334	32 228	32 419	20 349	4
G-IV-3	18 905	31 344	17 309	32 160	32 358	20 312	2

718 Table 3: Average number of SNPs per urine sample for the seven patients studied

719 Illumina reads were mapped to the corresponding PacBio reference using Snippy software. The mean number of SNPs/year (mutation rate, in square brackets) was calculated for isolates from each urine culture, based on the time elapsed since the previous urine culture. 720

7	^	1
1	L	I

Patient		А	В	С	D	Ε	F	G
Urine	Ι	0.8	1.4	0.2	2	0.6	0	0.4
culture	Π	0.2 [10]	2.8 [31]	1.2 [9]	89.6 [126]	0 [0]	7.4 [24]	0 [0]
	III	0.6 [3]	6.4 [8]			0.4 [2]		0 [0]
	IV		9 [9]			0.2 [1]		2.7 [4]
	V		5.8 [4]					

722

Table 4. PseudoCap function classification of genes affected by over time SNPs with moderate or high effect identified in isolates 724 collected from four patients (B, D, F, G) 725

Percent of SNPs identified per gene function are presented here. PseudoCap functions are available on the Pseudomonas Genome Database 726 (https://www.pseudomonas.com/) 727 AN

728

PseudoCap manually assigned functions	B- isolates	D- isolates	F- isolates	G- isolates
Adaptation, protection	0%	2%	11%	0%
Amino acid biosynthesis and metabolism	0%	2%	0%	0%
Antibiotic resistance and susceptibility	0%	2%	0%	0%
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	0%	2%	0%	0%
Carbon compound catabolism	0%	4%	0%	33%
Cell division	0%	2%	0%	0%
Cell wall / LPS / capsule	0%	4%	33%	0%
Central intermediary metabolism	0%	1%	0%	0%
Chemotaxis	33%	1%	0%	0%
DNA replication, recombination, modification and repair	0%	2%	0%	0%
Energy metabolism	0%	1%	0%	0%
Fatty acid and phospholipid metabolism	0%	0%	0%	33%
Membrane proteins	0%	13%	0%	0%
Motility & Attachment	33%	2%	0%	0%
Nucleotide biosynthesis and metabolism	0%	2%	0%	0%
Protein secretion/export apparatus	0%	3%	0%	0%
Putative enzymes	0%	6%	0%	0%
Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	0%	1%	11%	0%
Transcription, RNA processing and degradation	0%	3%	0%	0%
Transcriptional regulators	0%	7%	22%	33%
Translation, post-translational modification, degradation	0%	4%	0%	0%
Transport of small molecules	0%	5%	0%	0%
Two-component regulatory systems	33%	3%	11%	0%
Hypothetical, unclassified, unknown	0%	27%	11%	0%

730 Table 5: PseudoCap function classification of deleted genes identified in isolates collected from three patients (A, D, F)

- Percent of deleted genes per gene function are presented here. PseudoCap functions are available on the *Pseudomonas* Genome Database
 (https://www.pseudomonas.com/)
- 733 A convergent evolution by deletion was identifed in a common region between A- and F- isolates. Percent of deleted genes per gene function
- are indicated by "A- and F- isolates".
- 735
- 736

PseudoCap manually assigned functions	A-isolates	D-isolates	F-isolates	A- and F- isolates
Adaptation, Protection	1%	0%	1%	0%
Amino acid biosynthesis and metabolism	2%	0%	3%	4%
Antibiotic resistance and susceptibility	1%	0%	3%	2%
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	2%	0%	6%	8%
Carbon compound catabolism	5%	0%	13%	16%
Cell wall / LPS / Capsule	0%	0%	1%	0%
Central intermediary metabolism	2%	0%	2%	2%
Chaperones & heat shock proteins	1%	0%	1%	1%
DNA replication, recombination, modification and repair	1%	0%	0%	0%
Energy metabolism	1%	0%	1%	1%
Fatty acid and phospholipid metabolism	1%	0%	1%	1%
Membrane protein	7%	0%	9%	10%
Motility & Attachment	1%	0%	5%	0%
Nucleotide biosynthesis and metabolism	0%	0%	0%	0%
Putative enzymes	7%	0%	7%	8%
Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	0%	0%	0%	0%
Transcriptional regulators	7%	0%	11%	11%
Translation, post-translational modification, degradation	0%	0%	1%	1%
Transport of small molecules	7%	0%	9%	6%
Two-component regulatory systems	1%	0%	4%	5%
Hypothetical, unclassified, unknown	52%	100%	24%	23%





TIC TCC PIL PTZ CZD FEP ATM IMP MEM GMN TMN AKN LVX CIP



0.0000020






III.2. Principaux résultats

Sept patients (A à G) présentant deux à cinq ECBU consécutifs positifs à *P. aeruginosa* (I à V, distants de 48 à 488 jours) ont été inclus dans cette étude. Trois à 5 isolats par ECBU ont été collectés, soit un total de 108.

III.2.1. Données cliniques des patients

Les bactériuries successives à *P. aeruginosa* étaient symptomatiques ou non selon les patients (BA chronique chez 2 patients, IU au long cours chez un patient, et successions d'IU et de BA chez 4 patients).

Ces patients présentaient des pathologies de l'arbre urinaire (6 patients; à type d'hypertrophie bénigne de la prostate [3 patients], de dérivations des voies urinaires naturelles [2 patients] ou de transplantation rénale [1 patient]) et ont bénéficié d'une cathéterisation urinaire au long cours (4 patients). Tous avaient reçu au moins une cure d'antibiotiques dans les 6 mois précédant leur premier ECBU, et 5 d'entre eux dans l'intervalle séparant leur premier et leur dernier ECBU.

III.2.2. Profils de résistance aux antibiotiques

Lors du premier ECBU, les isolats présentaient un profil non-MDR chez 4 patients (C [phénotype sauvage], E, F, G), un profil MDR et XDR chez un patient (D et B, respectivement). Une diversité en termes de profils de résistance (4 isolats MDR et 1 isolat XDR) a été identifiée pour les isolats du patient A.

Les profils de résistance des isolats étaient similaires au cours du temps chez deux patients (B, E), alors que le taux de résistance a augmenté chez deux patients (C, G) et diminué chez un patient (F [phénotype sauvage lors du second ECBU]). La diversité intraprélèvement a augmenté au cours du temps chez 3 patients (A [phénotypes MDR et XDR], D [phénotypes sauvage et MDR], G [phénotypes sauvage, Non-MDR et MDR suivant les ECBU]). Néanmoins, aucune corrélation stricte entre les antécédents d'antibiothérapie et l'acquisition de résistance n'a pu être mise en évidence.

III.2.3. Adaptation moléculaire de P. aeruginosa au tractus urinaire

L'analyse génomique a été réalisée sur les 108 isolats inclus dans l'étude. Un isolat collecté au cours du premier ECBU de chaque patient (7 isolats) a été choisi comme isolat de référence pour chaque patient et séquencé selon la technique PacBio (Plateforme de séquençage Gentyane, Clermont-Ferrand) (permettant l'obtention de long *reads*). En cas d'antibiotypes différents, l'isolat le plus résistant a été choisi comme référence. Les 101 autres isolats ont été séquencés par la technique Illumina (Plateforme P2M, Institut Pasteur, Paris).

Les patients étaient colonisés ou infectés par un *clone-type* donné (< 6000 SNPs entre deux isolats, selon la définition de Marvig et *al.*(Marvig et al., 2015b)), en congruence avec l'analyse MLST. Néanmoins chez le patient F, une diversification en sous-populations a été identifiée chez les isolats collectés de façon longitudinale.

L'analyse génomique a permis d'identifier deux mécanismes principaux d'adaptation de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire : des SNPs et de larges délétions génomiques. Le taux de SNPs par génome et par an variait de 0 à 126. Des *over time* SNPs non sens ou faux sens (SNPs uniquement identifiés chez au moins 2 des isolats collectés de façon longitudinale) ont identifiés chez 4 patients (B, D, F, G). Aucune évolution convergente par SNPs n'a été identifiée mais un effectif plus important de patients serait nécessaire pour confirmer cette observation. En parallèle, de larges délétions génomiques (35 à 361 kpb) ont été identifiées au cours du temps chez 3 patients (A, D, F). Une évolution convergente par délétion (70 CDS, homologues aux gènes PA1965 à PA2034) a été observée chez deux de ces patients.

Ces modifications génomiques affectaient principalement des gènes codant des régulateurs transcriptionnels ou impliqués dans des systèmes à deux composants ou dans le catabolisme du carbone.

III.2.4. Impact des délétions génomiques sur le fitness et la formation de biofilm

Le fitness (en milieu riche et urinaire artificiel) et la capacité à former du biofilm en microplaque ont été évalués pour tous les isolats collectés chez 3 patients (A, D, F) pour identifier si les larges délétions génomiques observées pouvaient avoir une traduction phénotypique.

Les isolats délétés des 3 patients présentaient un fitness ralenti par rapport aux isolats ne présentant pas de délétions génomiques, réduction d'autant plus importante en milieu urinaire artificiel.

Les isolats des patients A et D présentaient une faible capacité à former du biofilm. A l'inverse, les isolats du premier ECBU du patient F étaient fortement producteurs de biofilm ; cette capacité était significativement réduite (P<0.01) chez les isolats collectés au cours du dernier ECBU de l'étude.

Il s'agit à notre connaissance de la première étude portant sur l'évolution génomique de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire. Elle montre que les patients étaient colonisés ou infectés par un seul *clone-type*, à un instant donné et au cours du temps, bien qu'une diversification en sous-populations ait été identifiée pour un patient. Par ailleurs, l'évolution génomique semblait majoritairement médiée par des mutations et de larges délétions génomiques, suggérant que *P. aeruginosa* s'adapte au tractus urinaire en modifiant son métabolisme et en mobilisant ses systèmes régulateurs. Ces modifications génomiques étaient, pour certaines, associées à des variations phénotypiques touchant le fitness et/ou la capacité des souches à former du biofilm.

Discussion générale

Dans le but de décrire l'épidémiologie moléculaire des bactériuries à *P. aeruginosa* et de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de cette espèce à l'arbre urinaire, nous avons constitué, sur une période de 27 mois, une cohorte de 120 patients hospitalisés au CHU de Rouen avec un diagnostic clinique d'IU (40) ou de BA (80).

Ce travail de Doctorat a comporté deux volets dont les objectifs étaient les suivants :

décrire la diversité génétique et phénotypique (profil de résistance aux antibiotiques) des souches responsables d'IU et de BA mais aussi la diversité intra-prélèvement (avec l'étude de 2 à 5 isolats par prélèvement) à la recherche de clones épidémiques ou adaptés à l'arbre urinaire ;

- étudier, grâce aux isolats collectés de façon longitudinale, la dynamique dans le temps des génotypes observés pour appréhender les changements évolutifs qui donneraient lieu à des avantages sélectifs.

Les patients inclus dans cette étude étaient hospitalisés dans des services cliniques divers et présentaient les caractéristiques précédemment décrites pour les IU à *P. aeruginosa* : sexe masculin, un diabète non compliqué, des pathologies du tractus urinaire, la présence de cathéter urinaire ainsi que des antécédents d'IU, d'antibiothérapies ou d'hospitalisation (Ledizet et al., 2012; Djordjevic et al., 2013; Zhang et al., 2014; Gomila et al., 2018). Ils présentaient également de nombreuses comorbidités, comme le révèlent le score de Charlson élevé (5,4) et un taux élevé de bactériémie associée. Cet indice de Charlson était proche de celui observé dans l'étude de Lamas Ferreiro et *al.* (Lamas Ferreiro et al., 2017) portant sur des patients atteints d'IU à *P. aeruginosa* (3,6). Ces caractéristiques étaient attendues puisque *P. aeruginosa* est principalement responsable d'IUAS chez des patients présentant un terrain débilité (Venier et al., 2012; Lamas Ferreiro et al., 2017; Gomila et al., 2018).

Afin d'inclure un nombre suffisant d'isolats pour des analyses statistiques, les premiers 40 ECBU et 80 ECBU responsables d'IU et de BA respectivement, ont été inclus

dans l'étude sur la base du diagnostic clinique retenu par le clinicien en charge du patient. Cette approche est critiquable car même si les dossiers ont été revus *a posteriori* par un comité d'infectiologues et de bactériologistes, la distinction entre IU et BA peut être délicate chez ce type de patients (Ledizet et al., 2012; Amarsy et al., 2019). De plus, comme seules les données clinico-biologiques du dossier médical informatisé ont été collectées, des données non tracées ont pu manquer dans l'analyse. Pour limiter ce biais, il aurait pu être intéressant de confronter de façon prospective les données recueillies avec les cliniciens en charge des patients.

I. Diversité moléculaire et phénotypique des isolats urinaires de P. aeruginosa

Le typage par MLST a été choisi pour étudier la diversité génétique des isolats urinaires de *P. aeruginosa*, méthode de typage la plus utilisée de par son pouvoir discriminant (Oliver et al., 2015; Parkins et al., 2018).

Les clones de ST234 et ST235, précédemment décrits au cours d'IU (Pobiega et al., 2015; Osawa et al., 2019), ont été identifiés au cours de cette étude. Parallèlement, 13 des 18 clones prévalents au niveau mondial (Oliver et al., 2015) étaient identifiés au sein des isolats de notre étude. Parmi eux, les trois principaux clones épidémiques à haut risque (ST111, ST175 et ST235), particulièrement décrits au cours d'infections respiratoires chroniques chez les patients atteints de CF (Oliver et al., 2015; Parkins et al., 2018), ont été détectés.

Aucune corrélation stricte n'a pu être observée au cours de notre étude entre le génotype de l'isolat et le contexte d'IU ou de BA associé. Par ailleurs, aucun ST nouveau n'a été décrit suggérant que les génotypes des souches urinaires de *P. aeruginosa* ne sont pas différents de ceux des souches responsables d'infections d'autres localisations. D'autres études ont montré que le génotypage par MLST ne permet pas de distinguer des souches cliniques et environnementales, ni des souches issues d'un site infectieux donné (Ozer et al., 2019; Magalhães et al., 2020). Ainsi, le typage par MLST ne permet pas de prédire le caractère infectieux d'isolats de *P. aeruginosa*.

Ces données diffèrent de celles rapportées chez *E. coli*, uropathogène pour lequel il existe une corrélation entre les phylogroupes et le contexte de prélèvement. En effet, les phylogroupes B2 et D sont majoritairement représentés au sein des souches responsables d'IU (Farajzadah Sheikh et al., 2019; Reitzer and Zimmern, 2019). De plus, lors d'une étude menée sur 233 patients présentant des bactériuries à *E. coli* (Amarsy et al., 2019), la proportion de ces phylogroupes était significativement plus élevée au sein des isolats responsables d'IU (80%) qu'au sein des isolats associés aux BA (62%).

De façon globale, et comme déjà décrit dans de précédentes études (Gomila et al., 2018; Jiménez-Guerra et al., 2018; Gajdács et al., 2019), les isolats analysés ici présentaient un taux élevé de résistance aux pénicillines, aux carbapénèmes et aux fluoroquinolones. La proportion d'isolats MDR (19%) et XDR (6%) était similaire à celles décrites au cours d'IU (9-29% d'isolats MDR et 2-12% d'isolats XDR) (Gomila et al., 2018; Gajdács et al., 2019) ou lors de programmes de surveillance épidémiologique mondiale des infections à *P. aeruginosa* (15-30% d'isolats MDR ou XDR) (Oliver and Mena, 2010). Des antécédents d'ECBU positifs à *P. aeruginosa* et de traitements antibiotiques (principalement par céphalosporines ou fluoroquinolones), comme rapporté par Raman et *al.* (Raman et al., 2018), induisaient une pression de sélection et étaient significativement associés à l'émergence d'isolats de phénotypes MDR et XDR.

Comme rapportés par (Gomila et al., 2013; Horcajada et al., 2019; Oliveira et al., 2020), les isolats non-MDR étaient principalement associés à des ST singletons au cours de notre étude, à l'origine d'une diversité génotypique. Les isolats MDR et XDR étaient à l'inverse associés à un nombre restreint de STs, dont les ST111, ST175 et ST235 correspondant aux trois principaux clones épidémiques à haut risque (Oliver et al., 2015).

II. Diversité moléculaire et phénotypique au sein d'un prélèvement

Afin d'identifier une diversité à un instant donné qui pourrait compliquer la prise en charge des patients, jusqu'à 5 isolats (lorsque la bactériurie était suffisante) ont été collectés par ECBU. La diversité intra-prélèvement a été analysée en termes de sensibilité aux antibiotiques et de typage par MLST.

Cette méthodologie a déjà été mise en œuvre par Mowat et *al.* (Mowat et al., 2011) qui ont analysé 40 isolats de *P. aeruginosa* par prélèvement respiratoire chez des patients atteints de CF. Leurs objectifs étaient d'étudier la diversité des isolats de différents patients et celle existant chez un patient à un instant donné ou au cours du temps, afin d'analyser les dynamiques de population de *P. aeruginosa*. Malgré le nombre plus faible d'isolats collectés par ECBU dans notre étude, la forte proportion de patients présentant une diversité en termes de profils de résistance (35 patients, 28%) suggère que le tractus urinaire pourrait représenter un environnement aussi complexe que l'arbre respiratoire. En effet, l'arbre respiratoire est constitué d'alvéoles pulmonaires qui constituent des niches environnementales. Chacune présente des propriétés distinctes, en termes de compétition bactérienne ou de pressions de sélection par le système immunitaire de l'hôte ou les antibiotiques, à l'origine d'une évolution adaptative spécifique à chaque niche (appelée *niche specialization*) (Marvig et al., 2015a; Didelot et al., 2016). Au sein du tractus urinaire, les sous-populations semblent majoritairement influencées par la dynamique du milieu et les variations de concentration des nutriments disponibles (Reitzer and Zimmern, 2019).

Cette diversité en termes de profil de résistance aux antibiotiques au sein d'un même prélèvement rappelle l'importance de prélever plusieurs colonies pour préparer l'inoculum lors de la réalisation d'un antibiogramme de *P. aeruginosa*. Pour ne pas passer à côté de cette diversité, réaliser l'antibiogramme directement à partir de l'urine du patient peut représenter une alternative particulièrement intéressante pour détecter d'éventuelles sous-populations résistantes aux antibiotiques (Coorevits et al., 2015). La concordance de cette approche avec les techniques classiques est estimée à 93% (Coorevits et al., 2015). Ce type d'approche d' « antibiogramme direct » est d'ailleurs réalisé au quotidien pour l'analyse microbiologique des prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Zebouh et al., 2008).

Un des points forts de ce travail est la description, pour la première fois à notre connaissance, d'IU ou de BA polyclonales à *P. aeruginosa* : des isolats appartenant à deux STs distincts ont en effet été identifiés chez 5 patients (4%).

Ce pourcentage était inférieur à celui décrit lors de l'étude de Waine et *al.* (Waine et al., 2009) portant sur le typage par MLST de 27 à 46 isolats par prélèvement respiratoire chez

60 patients atteints de CF. Parmi eux, 50% d'entre présentaient des isolats de 2 à 3 STs différents.

Pour 4 de nos patients, les STs différaient pour au moins 4 allèles, suggérant une cocolonisation par des clones distincts. Les antériorités bactériologiques auraient été intéressantes pour ces patients afin de distinguer une co-infection d'une surinfection, d'autant plus que 2 des 5 patients ont eu un ECBU positif à P. aeruginosa au cours des 6 mois précédents. Par ailleurs, ces 5 patients ont été hospitalisés dans les 6 mois précédant leur inclusion dans l'étude et 4 d'entre eux avaient reçu une antibiothérapie pouvant sélectionner l'émergence d'une sous-population résistante : la diversité génotypique étant systématiquement corrélée à une diversité en termes d'antibiorésistance. La présence de cathéter urinaire (3 patients) pourrait également avoir facilité la persistance de certaines lignées. Il serait intéressant pour ces isolats d'étudier leur capacité à former du biofilm et de réaliser des études transcriptomiques en milieu urinaire artificiel. Ces analyses pourraient permettre d'identifier les mécanismes qui ont favorisé leur implantation au sein du tractus urinaire et peut-être prédire la lignée qui aurait les capacités d'y persister.

En parallèle, le pouvoir discriminant du WGS (Chen et al., 2018) serait intéressant pour affiner l'exploration de la diversité des isolats de même ST. Le WGS a été réalisé chez les isolats de même STs collectés chez 7 patients, à la faveur de notre deuxième étude, et a confirmé l'identification d'un seul *clone type* par patient. Ainsi, l'épidémiologie génotypique définie par MLST était congruente avec l'épidémiologie moléculaire par NGS.

III. Diversité au cours du temps et adaptation à l'hôte

Afin d'investiguer les mécanismes de la persistance de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire et les causes des échecs thérapeutiques, des isolats séquentiels ont été collectés chez 7 patients présentant 2 à 5 ECBU successifs positifs à *P. aeruginosa*. Au total, 108 isolats (jusqu'à 5 par ECBU) ont été séquencés par WGS.

Les patients inclus dans l'étude étaient infectés ou colonisés au cours du temps par un *clone-type* donné. Néanmoins, comme dans les études longitudinales portant sur des isolats respiratoires de patients atteints de CF (Marvig et al., 2015b; Bianconi et al., 2018; Bartell et al., 2019), nos travaux ont mis en évidence une diversification génomique des isolats urinaires de *P. aeruginosa* au cours du temps, plusieurs sous-populations ayant été identifiées chez un même patient.

III.1. Principaux mécanismes moléculaires d'adaptation

Deux mécanismes principaux dans l'adaptation de *P. aeruginosa* au tractus urinaire ont été identifiés : des SNPs et de larges délétions génomiques.

Afin de comparer quantitativement la microévolution de *P. aeruginosa* au cours d'infections chroniques respiratoires et urinaires, le nombre moyen de SNPs par génome et par an a été calculé pour les isolats de chaque ECBU. Ce taux, variant de 0 à 126, était comparable pour certaines souches à celui décrit pour les souches non hypermutatrices isolées chez des patients atteints de CF (1-3) (Marvig et al., 2015a). Le taux élevé de SNPs/génome/an identifié chez un patient (126) était proche de celui identifié chez les souches hypermutatrices (89-106) (Marvig et al., 2015a). Pour ce patient, aucune mutation n'a été identifiée au sein des gènes codant les systèmes de réparation de l'ADN (*mutS* et *mutL*), caractéristique des souches hypermutatrices (Colque et al., 2020). En revanche, deux SNPs ont été identifié au sein de genes impliqués dans la réplication, la recombinaison ou la réplication de l'ADN, comme précédemment décrit (Qin et al., 2018). Il serait intéressant de confirmer *in vitro* ce phénotype hypermutateur par la distribution de la fréquence de mutations (Oliver et al., 2000).

Pour identifier les mutations qui pourraient avoir un impact majeur dans l'adaptation de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire, nous nous sommes focalisés par la suite sur les

over time SNPs associés à des mutations non-silencieuses ou des codons stop. Ces SNPs ont été identifiés chez quatre patients de notre étude, dont les ECBU étaient espacés de plus de 100 jours. A la différence des études longitudinales portant sur les infections respiratoires (Marvig et al., 2015b), aucun gène pathoadaptatif (gènes mutés communs chez distinctes souches collectées dans un contexte infectieux donnée) n'a été identifié, suggérant une absence d'évolution convergente par mutations. Néanmoins, les gènes codant des régulateurs transcriptionnels ou impliqués dans des systèmes à deux composants étaient les plus fréquemment mutés. Ces observations avaient déjà été rapportées dans l'étude de Marvig et *al.*, 2015b) au cours de laquelle 10 des 52 gènes pathoadaptatifs codaient des régulateurs transcriptionnels.

Parallèlement à l'évolution par SNPs, la persistance de *P. aeruginosa* au cours du temps pourrait être associée à la perte de matériel génétique, comme précédemment décrit dans le cadre d'infections respiratoires chroniques (Bianconi et al., 2018). En effet, de larges délétions génomiques (35 à 361 kpb) ont été identifiées chez certains isolats collectés chez trois de nos patients. Ces délétions apparaissaient plus petites (1 à 5%) que celles décrites par Rau et *al.* (Rau et al., 2012), qui pouvaient atteindre 8% (525 kpb) de la taille du génome de référence.

Les gènes *hmgA* (codant une homogentisate 1,2-dioxygenase) et *galU* (codant une UDP-glucose phosphorylase impliquée dans la synthèse du LPS) ont été identifiés parmi les genes délétés chez deux patients (Cabot et al., 2016b; López-Causapé et al., 2018; Wardell et al., 2019). Ces délétions ont été décrites dans de précédentes études *in vitro* (après exposition au méropénème) et *in vivo* (lors d'infections respiratoires chroniques) (Cabot et al., 2016b; López-Causapé et al., 2018; Wardell et al., 2019). Ici comme ailleurs, la délétion du gène *hmgA* était associée à la production de pyomélanine. De plus, il a précédemment été décrit que la délétion du gène *galU* (impliqué dans la synthèse du LPS) entraîne une diminution de l'effet immunogène du LPS, qui de ce fait promeut l'évasion immunitaire de *P. aeruginosa* et sa persistance au cours d'infections respiratoires chroniques (Rodríguez-Rojas et al., 2009; Hocquet et al., 2016).

Chez ces deux patients, une région commune de 70 CDS (PA1965 à PA2034) était délétée au cours du temps, suggérant une évolution convergente par délétion. Ce type d'évolution convergente a été précédemment décrit dans des études *in vitro* ou *in vivo*, au

cours desquelles des gènes à proximité du gène *hmgA* (Pa1974 à PA2019 ou PA2022 à PA2208) étaient délétés (Hocquet et al., 2016; Wardell et al., 2019). Ainsi, la délétion de larges fragments génomiques, à proximité du gène *hmgA*, semble apporter un avantage sélectif à la survie de *P. aeruginosa* au cours d'infections chroniques. Les gènes délétés codaient des protéines majoritairement impliquées dans le catabolisme du carbone, des protéines de membrane et des régulateurs transcriptionnels.

Certaines limites d'analyse de l'adaptation moléculaire de *P. aeruginosa* peuvent cependant être soulevées dans notre étude. Seuls 5 isolats ont été collectés par ECBU ; ainsi, des adaptations génomiques identifiées au cours du temps pouvaient être présentes chez des isolats du premier ECBU qui n'ont pas été inclus. De plus, deux approches de séquençage (PacBio et Illumina) ont été utilisées, pouvant biaiser l'identification des SNPs. Néanmoins, à la différence des études réalisées au cours d'infections respiratoires chroniques qui utilisent une souches de référence externe (PAO1, DK2) (Marvig et al., 2015b; Bianconi et al., 2018), l'évolution au cours du temps a été réalisée par *mapping* des courts *reads* des isolats sur les longs *reads* d'une souche de référence collectée chez le même patient. La distance génétique des séquences mappées vis-à-vis de la séquence de référence étant réduite, le nombre de gènes pris en compte dans l'analyse du *core-genome* a ainsi été maximisé.

Par ailleurs, il serait intéressant de compléter l'étude des mécanismes d'évolution génomique de *P. aeruginosa* par une recherche des mouvements des éléments génétiques mobiles, et particulièrement par celle des séquences d'insertions, décrites comme jouant un rôle dans l'évolution genomique (Vandecraen et al., 2017; Treepong et al., 2018; Mogro et al., 2020).

III.2. Principales voies d'adaptation phénotypique de *P. aeruginosa* au tractus urinaire

De façon surprenante et à la différence des études longitudinales réalisés chez des patients atteints de mucoviscidose chez lesquels l'acquisition de résistance semble être un facteur majeur dans l'adaptation à l'hôte (Marvig et al., 2015b; López-Causapé et al., 2018; Colque et al., 2020), la résistance aux antibiotiques ne constituait pas un facteur prédominant dans l'adaptation de *P. aeruginosa* au tractus urinaire. Cependant, notre étude a été conduite

sur une échelle de temps plus courte (48 à 488 jours) que celle des études longitudinales menées chez des patients atteints de mucoviscidose (menée sur plusieurs années, parfois jusqu'à 32 ans) (Markussen et al., 2014; Marvig et al., 2015b; Bianconi et al., 2018). De plus, l'évolution des recommandations de prise en charge des IUAS (SF2H et al., 2015), recommandant de ne pas traiter les bactériuries asymptomatiques et de ne plus effectuer systématiquement d'ECBU de contrôle, pourrait avoir limité les prescriptions antibiotiques et ainsi les pressions de sélection exercées sur les souches et l'émergence d'antibiorésistance.

En revanche, l'adaptation de *P. aeruginosa* au tractus urinaire était majoritairement associée à des mutations et/ou des délétions au sein de gènes codant des régulateurs transcriptionnels ou impliqués dans les systèmes à deux composants ou le catabolisme de composés carbonés.

La régulation des modes de vie de *P. aeruginosa* est très complexe. Elle consiste en de nombreux systèmes interconnectés (Balasubramanian et al., 2013), impliqués dans la régulation de la virulence, de la formation de biofilm et de la résistance aux antibiotiques (Francis et al., 2017; Tierney and Rather, 2019). Ainsi, l'impact des modifications génomiques observées demeure difficile à appréhender, nécessitant des analyses complémentaires.

Une réduction du répertoire catabolique a été précédemment identifiée chez des souches de *P. aeruginosa* responsables d'infections respiratoires chroniques (La Rosa et al., 2019). De façon similaire, au sein d'un environnement pauvre en oxygène tel que le tractus urinaire (Ipe et al., 2016), *P. aeruginosa* peut diversifier ses sources d'énergie d'origine carbonées au profit de sources issues de la dénitrification ou de la fermentation de l'arginine (Tielen et al., 2013). De même, *E. coli* est amené à surexprimer les gènes impliqués dans l'utilisation de l'arginine pour survivre en milieu urinaire (Reitzer and Zimmern, 2019). Ainsi, la forte plasticité métabolique de *P. aeruginosa* (Dolan et al., 2020) pourrait lui permettre de maximiser le rendement énergétique des sources carbonées disponibles et préférentiellement utilisées au cours d'infections chroniques, respiratoires (La Rosa et al., 2019) ou urinaires (Tielen et al., 2013), notamment les acides aminés, le lactate et le citrate.

III.3. Associations génotypes-phénotypes

L'impact des modifications génomiques sur l'adaptation phénotypique demeure difficile à évaluer de part les nombreuses voies de régulations impliquées, mais les approches phénotypiques paraissent complémentaires et essentielles pour décrire formellement les mécanismes d'adaptation à l'hôte (Bartell et al., 2019).

Bien que la corrélation entre l'antibiorésistance et le typage par MLST soit plutôt bien décrite, en lien avec l'émergence de clones épidémiques à haut risque (Oliver et al., 2015; Oliveira et al., 2020), la corrélation entre antibiotype et résistome demeure plus fragile. En effet, de nombreuses études ont caractérisé le résistome mutationnel de *P. aeruginosa* et ainsi identifié plusieurs gènes cibles dans la résistance aux antibiotiques. Néanmoins, des approches complémentaires de transcriptomique (RT-PCR, RNA-Seq) sont nécessaires afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes et confirmer l'impact clinique des variations génomiques (Cabot et al., 2016b; Del Barrio-Tofiño et al., 2017; López-Causapé et al., 2018).

La capacité de formation du biofilm est une caractéristique fréquemment décrite chez les souches responsables d'infections respiratoires chroniques (Winstanley et al., 2016). Elle est rendue possible par une transition vers un mode de vie sessile, majoritairement sous le contrôle du second messager c-di-GMP (Valentini and Filloux, 2016; Olivares et al., 2019). La production et la dégradation du c-di-GMP est régulée par plus de 40 protéines (Klockgether and Tümmler, 2017). Ainsi, de nombreuses cibles moléculaires peuvent intervenir dans la formation de biofilm.

Chez un patient, dont les isolats présentant une délétion génomique possédaient une capacité à former du biofilm plus faible, des SNPs ont été identifiés au sein de gènes impliqués dans la synthèse d'alginate et la formation de biofilm (*algB*, *algG*, *mucA*). En parallèle chez un second patient, pour lesquels les isolats présentant une délétion génomique produisaient significativement plus de biofilm, des gènes délétés codaient une protéine contenant un domaine EAL (impliqué dans la dégradation du c-di-GMP). Des SNPs et des délétions au sein de gènes codant des régulateurs transcriptionnels ou des systèmes à deux composants, régulant la virulence et les transitions entre les modes de vie de *P. aeruginosa* (Valentini and Filloux, 2016; Francis et al., 2017), étaient également identifiés.

A l'avenir, des approches complémentaires à l'analyse génomique seraient intéressantes pour appréhender le phénotype des isolats de notre étude. En effet, des études du *core-transcriptome* et du *core-proteome* des cellules en biofilm de *P. aeruginosa* ont montré que les phénotypes de biofilm n'étaient pas nécessairement corrélés à des fonds génétiques distincts des souches (Erdmann et al., 2019; Thöming et al., 2020).

Les mécanismes qui sous-tendent ces variations en termes de fitness sont encore mal connus, bien que celui-ci soit fréquemment étudié (Parkins et al., 2018; Horcajada et al., 2019; La Rosa et al., 2019; Harrison et al., 2020). Une diminution du fitness des isolats présentant une délétion génomique a été identifiée chez les trois patients, particulièrement en milieu urinaire artificiel. La diminution du fitness est fréquemment objectivée au cours des infections chroniques (Coggan and Wolfgang, 2012), notamment chez des isolats présentant de larges délétions génomiques (Rodríguez-Rojas et al., 2009); elle est associée à une diminution de la clairance *in vivo* et ainsi à la persistance de *P. aeruginosa*. La réorganisation des systèmes de régulation (associées aux SNPs et/ou délétions génomiques au sein des gènes codant les régulateurs transcriptionnels ou impliqués dans les systèmes à deux composants) pourrait avoir joué un rôle dans cette adaptation.

Au total, des études complémentaires de métabolomique et de transcriptomique seraient intéressantes pour confirmer les voies d'adaptation à l'arbre urinaire identifiées par l'analyse génomique. De plus, une approche métagénomique, menée directement depuis l'urine des patients, pourrait permettre d'identifier l'ensemble des populations microbiennes présentes dans l'urine, et de rechercher les caractéristiques du microbiome urinaire qui donnent lieu au développement d'une IU à *P. aeruginosa*.

Conclusion générale

Ce travail a permis d'identifier une diversité phénotypique et génotypique des isolats collectés chez un patient donné, au sein d'un même prélèvement et au cours du temps, qu'ils soient associés à une infection ou une colonisation urinaire. Ainsi, nous avons pu décrire pour la première fois des infections urinaires polyclonales à *P. aeruginosa*. Néanmoins au cours du temps, les isolats de *P. aeruginosa* d'un patient donné appartenaient à un seul *clone type*, bien qu'une diversification en sous-populations ait été identifiée.

De plus, nous avons mis en évidence une adaptation moléculaire des isolats de *P. aeruginosa* au sein du tractus urinaire, par mutations et/ou par délétions. Ces modifications génomiques affectaient majoritairement des gènes codant des régulateurs transcriptionnels ou impliqués dans les systèmes à deux composants ou le catabolisme du carbone.

Cette adaptation génomique était associée pour certains isolats à une adaptation phénotypique, en termes de résistance aux antibiotiques, de formation de biofilm et/ou de fitness.

Il serait intéressant de compléter ce travail par l'analyse d'un nombre plus important d'isolats par échantillon, sur une période d'étude plus longue. Des analyses complémentaires, phénotypiques et transcriptomiques, seraient également intéressantes pour identifier plus finement les voies métaboliques mises en jeu dans l'adaptation de *P. aeruginosa* au tractus urinaire.

Références bibliographiques

- Abdouchakour, F., Dupont, C., Grau, D., Aujoulat, F., Mournetas, P., Marchandin, H., et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7509–7524. doi:10.1128/AEM.01279-15.
- Acosta, N., Waddell, B., Heirali, A., Somayaji, R., Surette, M. G., Workentine, M. L., et al. (2020). Cystic Fibrosis Patients Infected With Epidemic *Pseudomonas aeruginosa* Strains Have Unique Microbial Communities. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00173.
- Adams, M. D., Bishop, B., and Wright, M. S. (2016). Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. *Microb. Genomics* 2. doi:10.1099/mgen.0.000062.
- Amarasinghe, S. L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M. E., and Gouil, Q. (2020). Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol.* 21, 30. doi:10.1186/s13059-020-1935-5.
- Amarsy, R., Guéret, D., Benmansour, H., Flicoteaux, R., Berçot, B., Meunier, F., et al. (2019). Determination of *Escherichia coli* phylogroups in elderly patients with urinary tract infection or asymptomatic bacteriuria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 839–844. doi:10.1016/j.cmi.2018.12.032.
- Bala, A., Chhibber, S., and Harjai, K. (2014). *Pseudomonas* quinolone signalling system: a component of quorum sensing cascade is a crucial player in the acute urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 304, 1199–1208. doi:10.1016/j.ijmm.2014.08.013.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., and Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–20. doi:10.1093/nar/gks1039.
- Bartell, J. A., Sommer, L. M., Haagensen, J. A. J., Loch, A., Espinosa, R., Molin, S., et al. (2019). Evolutionary highways to persistent bacterial infection. *Nat. Commun.* 10, 629. doi:10.1038/s41467-019-08504-7.
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., and Khedher, M. (2011). [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 69, 393–403. doi:10.1684/abc.2011.0589.
- Berka, R. M., Gray, G. L., and Vasil, M. L. (1981). Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun.* 34, 1071–1074.
- Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., et al. (2015). Mutations in β-Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6248–6255. doi:10.1128/AAC.00825-15.

- Bianconi, I., D'Arcangelo, S., Esposito, A., Benedet, M., Piffer, E., Dinnella, G., et al. (2018). Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study. *Front. Microbiol.* 9, 3242. doi:10.3389/fmicb.2018.03242.
- Botelho, J., Grosso, F., and Peixe, L. (2018). Unravelling the genome of a *Pseudomonas* aeruginosa isolate belonging to the high-risk clone ST235 reveals an integrative conjugative element housing a blaGES-6 carbapenemase. J. Antimicrob. Chemother. 73, 77–83. doi:10.1093/jac/dkx337.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., et al. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 48, 1–12. doi:10.1086/595011.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330. doi:10.1038/nrmicro.2016.34.
- Caballero, J. D., Clark, S. T., Coburn, B., Zhang, Y., Wang, P. W., Donaldson, S. L., et al. (2015). Selective Sweeps and Parallel Pathoadaptation Drive *Pseudomonas aeruginosa* Evolution in the Cystic Fibrosis Lung. *mBio* 6, e00981-15. doi:10.1128/mBio.00981-15.
- Cabot, G., López-Causapé, C., Ocampo-Sosa, A. A., Sommer, L. M., Domínguez, M. Á., Zamorano, L., et al. (2016a). Deciphering the Resistome of the Widespread *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 175 International High-Risk Clone through Whole-Genome Sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother*. 60, 7415–7423. doi:10.1128/AAC.01720-16.
- Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J., et al. (2016b).
 Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1767–1778. doi:10.1128/AAC.02676-15.
- Centers for Disease Control and Prevention (2019). Antibiotic resistant threats in the United States 2019. Available at: https://cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf [Accessed May 28, 2020].
- Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques (2018). Rapport d'activité 2018. Available at: http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/bilans-dactivite.html [Accessed April 17, 2020].
- Chen, J.-W., Lau, Y. Y., Krishnan, T., Chan, K.-G., and Chang, C.-Y. (2018). Recent Advances in Molecular Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* Infection by State-ofthe-Art Genotyping Techniques. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01104.
- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., et al. (1996). Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet Lond. Engl.* 348, 639–642. doi:10.1016/S0140-6736(96)05169-0.

- Chung, J. C. S., Becq, J., Fraser, L., Schulz-Trieglaff, O., Bond, N. J., Foweraker, J., et al. (2012). Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* 194, 4857–4866. doi:10.1128/JB.01050-12.
- Ciofu, O., Mandsberg, L. F., Bjarnsholt, T., Wassermann, T., and Høiby, N. (2010). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 1108–1119. doi:10.1099/mic.0.033993-0.
- Ciofu, O., and Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00913.
- CNR Rapport d'activité 2017. Available at: http://www.cnr-resistanceantibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2017_VF_2.pdf [Accessed April 19, 2019].
- Coggan, K. A., and Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.* 14, 47–70.
- Cole, S. J., Hall, C. L., Schniederberend, M., Iii, J. M. F., Goodson, J. R., Pesci, E. C., et al. (2018). Host suppression of *quorum sensing* during catheter-associated urinary tract infections. *Nat. Commun.* 9, 4436. doi:10.1038/s41467-018-06882-y.
- Cole, S. J., Records, A. R., Orr, M. W., Linden, S. B., and Lee, V. T. (2014). Catheterassociated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. *Infect. Immun.* 82, 2048–2058. doi:10.1128/IAI.01652-14.
- Colque, C. A., Albarracín Orio, A. G., Feliziani, S., Marvig, R. L., Tobares, A. R., Johansen, H. K., et al. (2020). Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* Exploits Multiple Genetic Pathways To Develop Multidrug Resistance during Long-Term Infections in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother*. 64. doi:10.1128/AAC.02142-19.
- Coorevits, L., Boelens, J., and Claeys, G. (2015). Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 34, 1207–1212. doi:10.1007/s10096-015-2349-2.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., and Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. Sci. Am. 238, 86–95.
- CPias (2018). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017. Available at: http://www.cpias.fr/ES/surveillance/synthese_ENP2017.pdf [Accessed October 8, 2018].

- Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C. F., and Tümmler, B. (2011). Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ. Microbiol.* 13, 1690–1704. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02483.x.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., and Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 42, 5644–5649. doi:10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
- Daniau, C., Léon, L., Blanchard, H., Bernet, C., Caillet-Vallet, E., Glorion, S., et al. (2020). Infections associées aux soins en établissement de santé : résultats de l'Enquête nationale de prévalence 2017, France. Available at: http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2020/21/2020_21_1.html [Accessed September 21, 2020].
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., and Pesci, E. C. (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J. Bacteriol.* 184, 6481–6489.
- Dasgupta, N., Arora, S. K., and Ramphal, R. (2004). "The Flagellar System of Pseudomonas aeruginosa," in Pseudomonas: Volume 1 Genomics, Life Style and Molecular Architecture, ed. J.-L. Ramos (Boston, MA: Springer US), 675–698. doi:10.1007/978-1-4419-9086-0_22.
- de Bentzmann, S., and Plésiat, P. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe. *Rev. Francoph. Lab.* 2011, 73–81. doi:10.1016/S1773-035X(11)71104-2.
- de Sales, R. O., Migliorini, L. B., Puga, R., Kocsis, B., and Severino, P. (2020). A Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01049.
- Del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Cabot, G., Rivera, A., Benito, N., Segura, C., et al. (2017). Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother*. 61. doi:10.1128/AAC.01589-17.
- Didelot, X., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W., and Wilson, D. J. (2016). Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 150–162. doi:10.1038/nrmicro.2015.13.
- Djordjevic, Z., Folic, M. M., Zivic, Z., Markovic, V., and Jankovic, S. M. (2013). Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: sensitivity to antibiotics and risk factors. *Am. J. Infect. Control* 41, 1182–1187. doi:10.1016/j.ajic.2013.02.018.
- Dolan, S. K., Kohlstedt, M., Trigg, S., Ramirez, P. V., Kaminski, C. F., Wittmann, C., et al. (2020). Contextual Flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* Central Carbon Metabolism during Growth in Single Carbon Sources. *mBio* 11. doi:10.1128/mBio.02684-19.

- Dotson, G. A., Program, N. C. S., Dekker, J. P., Palmore, T. N., Segre, J. A., and Conlan, S. (2016). Draft Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Positive Sequence Type 111 *Pseudomonas aeruginosa* Strain. *Genome Announc* 4, e01663-15. doi:10.1128/genomeA.01663-15.
- ECDC (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018 [Accessed January 13, 2020].
- Erdmann, J., Thöming, J. G., Pohl, S., Pich, A., Lenz, C., and Häussler, S. (2019). The Core Proteome of Biofilm-Grown Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8101129.
- Farajzadah Sheikh, A., Goodarzi, H., Yadyad, M. J., Aslani, S., Amin, M., Jomehzadeh, N., et al. (2019). Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infect. Drug Resist.* 12, 2039–2047. doi:10.2147/IDR.S199764.
- Feliziani, S., Marvig, R. L., Luján, A. M., Moyano, A. J., Di Rienzo, J. A., Krogh Johansen, H., et al. (2014). Coexistence and within-host evolution of diversified lineages of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis infections. *PLoS Genet.* 10, e1004651. doi:10.1371/journal.pgen.1004651.
- Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., et al. (2011). Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. *Infect. Immun.* 79, 1176–1186. doi:10.1128/IAI.00850-10.
- Fraile-Ribot, P. A., Mulet, X., Cabot, G., Barrio-Tofiño, E. del, Juan, C., Pérez, J. L., et al. (2017). *In Vivo* Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin–β-Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2 β-Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01117-17. doi:10.1128/AAC.01117-17.
- Francis, V. I., Stevenson, E. C., and Porter, S. L. (2017). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. doi:10.1093/femsle/fnx104.
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., et al. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 11, 109–120. doi:10.1093/gbe/evy259.
- Gajdács, M., Burián, K., and Terhes, G. (2019). Resistance Levels and Epidemiology of Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria in Urinary Tract Infections of Inpatients and Outpatients (RENFUTI): A 10-Year Epidemiological Snapshot. *Antibiot. Basel Switz*. 8. doi:10.3390/antibiotics8030143.
- García-Castillo, M., del Campo, R., Morosini, M. I., Riera, E., Cabot, G., Willems, R., et al. (2011). Wide Dispersion of ST175 Clone despite High Genetic Diversity of Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains in 16 Spanish Hospitals. J. Clin. Microbiol. 49, 2905–2910. doi:10.1128/JCM.00753-11.

- Gellatly, S. L., and Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67, 159–173. doi:10.1111/2049-632X.12033.
- Gloag, E. S., Marshall, C. W., Snyder, D., Lewin, G. R., Harris, J. S., Santos-Lopez, A., et al. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Interstrain Dynamics and Selection of Hyperbiofilm Mutants during a Chronic Infection. *mBio* 10. doi:10.1128/mBio.01698-19.
- Gómez-Zorrilla, S., Juan, C., Cabot, G., Camoez, M., Tubau, F., Oliver, A., et al. (2016). Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 368–374. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.010.
- Gomila, A., Carratalà, J., Eliakim-Raz, N., Shaw, E., Wiegand, I., Vallejo-Torres, L., et al. (2018). Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study. *Infect. Drug Resist.* 11, 2571–2581. doi:10.2147/IDR.S185753.
- Gomila, M., Del Carmen Gallegos, M., Fernández-Baca, V., Pareja, A., Pascual, M., Díaz-Antolín, P., et al. (2013). Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol*. 13, 138. doi:10.1186/1471-2180-13-138.
- Hagemann, J. B., Pfennigwerth, N., Gatermann, S. G., von Baum, H., and Essig, A. (2018). KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1812–1814. doi:10.1093/jac/dky105.
- Hallin, M., Deplano, A., and Struelens, M. J. (2012). "Molecular Typing of Bacterial Pathogens: A Tool for the Epidemiological Study and Control of Infectious Diseases," in *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, eds. S. Morand, F. Beaudeau, and J. Cabaret (Dordrecht: Springer Netherlands), 9–25. doi:10.1007/978-94-007-2114-2_2.
- Hansen, S. K., Rau, M. H., Johansen, H. K., Ciofu, O., Jelsbak, L., Yang, L., et al. (2012). Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in the paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *ISME J.* 6, 31–45. doi:10.1038/ismej.2011.83.
- Harrison, J. J., Almblad, H., Irie, Y., Wolter, D. J., Eggleston, H. C., Randall, T. E., et al. (2020). Elevated exopolysaccharide levels in *Pseudomonas aeruginosa* flagellar mutants have implications for biofilm growth and chronic infections. *PLOS Genet.* 16, e1008848. doi:10.1371/journal.pgen.1008848.
- Häußler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa. Environ. Microbiol.* 6, 546–551. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x.
- Hoang, S., Georget, A., Asselineau, J., Venier, A.-G., Leroyer, C., Rogues, A. M., et al. (2018). Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. *PloS One* 13, e0193300. doi:10.1371/journal.pone.0193300.

- Hocquet, D., Petitjean, M., Rohmer, L., Valot, B., Kulasekara, H. D., Bedel, E., et al. (2016). Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environ. Microbiol.* 18, 3482–3493. doi:10.1111/1462-2920.13336.
- Hong, J. S., Kim, J. O., Lee, H., Bae, I. K., Jeong, S. H., and Lee, K. (2015). Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Infect. Chemother.* 47, 33–40. doi:10.3947/ic.2015.47.1.33.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., et al. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00031-19. doi:10.1128/CMR.00031-19.
- Høyland-Kroghsbo, N. M., Paczkowski, J., Mukherjee, S., Broniewski, J., Westra, E., Bondy-Denomy, J., et al. (2017). *Quorum sensing* controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 131–135. doi:10.1073/pnas.1617415113.
- 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, e00199-10. doi:10.1128/mBio.00199-10.
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., and Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathog. Basel Switz.* 9. doi:10.3390/pathogens9010006.
- Ipe, D. S., Horton, E., and Ulett, G. C. (2016). The Basics of Bacteriuria: Strategies of Microbes for Persistence in Urine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00014.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., and Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*. *Mol. Biol. Rev. MMBR* 76, 46–65. doi:10.1128/MMBR.05007-11.
- Jiménez-Guerra, G., Heras-Cañas, V., Gutiérrez-Soto, M., Del Pilar Aznarte-Padial, M., Expósito-Ruiz, M., Navarro-Marí, J. M., et al. (2018). Urinary tract infection by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. *J. Med. Microbiol.* 67, 790–797. doi:10.1099/jmm.0.000742.
- Jones, A. K., Fulcher, N. B., Balzer, G. J., Urbanowski, M. L., Pritchett, C. L., Schurr, M. J., et al. (2010). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU Regulon through *mucA* Mutation Inhibits Cyclic AMP/Vfr Signaling. *J. Bacteriol.* 192, 5709–5717. doi:10.1128/JB.00526-10.
- Khademi, S. M. H., Sazinas, P., and Jelsbak, L. (2019). Within-Host Adaptation Mediated by Intergenic Evolution in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol. Evol.* 11, 1385–1397. doi:10.1093/gbe/evz083.

- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., and Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PloS One* 7, e44199. doi:10.1371/journal.pone.0044199.
- Kilmury, S. L. N., and Burrows, L. L. (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both *Twitching* and *Swimming* Motilities. *mBio* 9. doi:10.1128/mBio.01310-18.
- Klockgether, J., and Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas* aeruginosa as a pathogen. *F1000Research* 6. doi:10.12688/f1000research.10506.1.
- Kwong, J. C., Mccallum, N., Sintchenko, V., and Howden, B. P. (2015). Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology (Phila.)* 47, 199– 210. doi:10.1097/PAT.0000000000235.
- La Rosa, R., Johansen, H. K., and Molin, S. (2019). Adapting to the Airways: Metabolic Requirements of *Pseudomonas aeruginosa* during the Infection of Cystic Fibrosis Patients. *Metabolites* 9. doi:10.3390/metabo9100234.
- LaBauve, A. E., and Wargo, M. J. (2012). Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa. Curr. Protoc. Microbiol.* 0 6, Unit-6E.1. doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25.
- Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J. R., et al. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0178178.
- Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., et al. (2014). Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 4, 4738. doi:10.1038/srep04738.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14.
- Ledizet, M., Murray, T. S., Puttagunta, S., Slade, M. D., Quagliarello, V. J., and Kazmierczak, B. I. (2012). The ability of virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa* to predict clinical disease in hospitalized patients. *PloS One* 7, e49578. doi:10.1371/journal.pone.0049578.
- Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K., and Kim, B. S. (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 290–295. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.11.012.
- Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy *quorum sensing* network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x.

- Lee, K., and Yoon, S. S. (2017). Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. J. Microbiol. Biotechnol. 27, 1053–1064. doi:10.4014/jmb.1611.11056.
- Li, G., Shen, M., Le, S., Tan, Y., Li, M., Zhao, X., et al. (2016). Genomic analyses of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* PA1 resequenced by single-molecule real-time sequencing. *Biosci. Rep.* 36, e00418. doi:10.1042/BSR20160282.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09.
- Liu, C., Sun, D., Zhu, J., Liu, J., and Liu, W. (2020). The Regulation of Bacterial Biofilm Formation by cAMP-CRP: A Mini-Review. *Front. Microbiol.* 11, 802. doi:10.3389/fmicb.2020.00802.
- López-Causapé, C., Cabot, G., Del Barrio-Tofiño, E., and Oliver, A. (2018). The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 9, 685. doi:10.3389/fmicb.2018.00685.
- López-Causapé, C., Sommer, L. M., Cabot, G., Rubio, R., Ocampo-Sosa, A. A., Johansen, H. K., et al. (2017). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-05621-5.
- Magalhães, B., Valot, B., Abdelbary, M. M. H., Prod'hom, G., Greub, G., Senn, L., et al. (2020). Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. *Front. Public Health* 8, 3. doi:10.3389/fpubh.2020.00003.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., and Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 480–493. doi:10.1093/femsre/fuw007.
- Malhotra, S., Hayes, D., and Wozniak, D. J. (2019). Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin. Microbiol. Rev.* 32. doi:10.1128/CMR.00138-18.
- Malhotra, S., Limoli, D. H., English, A. E., Parsek, M. R., and Wozniak, D. J. (2018). Mixed Communities of Mucoid and Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Exhibit Enhanced Resistance to Host Antimicrobials. *mBio* 9, e00275-18. doi:10.1128/mBio.00275-18.
- Malone, J. G. (2015). Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect. Drug Resist.* 8, 237–247. doi:10.2147/IDR.S68214.

- Marko, V. A., Kilmury, S. L. N., MacNeil, L. T., and Burrows, L. L. (2018). Pseudomonas aeruginosa type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. PLoS Pathog. 14. doi:10.1371/journal.ppat.1007074.
- Markussen, T., Marvig, R. L., Gómez-Lozano, M., Aanæs, K., Burleigh, A. E., Høiby, N., et al. (2014). Environmental Heterogeneity Drives Within-Host Diversification and Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 5, e01592-14. doi:10.1128/mBio.01592-14.
- Martins, V. V., Pitondo-Silva, A., Manço, L. de M., Falcão, J. P., Freitas, S. dos S., da Silveira, W. D., et al. (2014). Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 122, 92–100. doi:10.1111/apm.12112.
- Marvig, R. L., Johansen, H. K., Molin, S., and Jelsbak, L. (2013). Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS Genet.* 9, e1003741. doi:10.1371/journal.pgen.1003741.
- Marvig, R. L., Sommer, L. M., Jelsbak, L., Molin, S., and Johansen, H. K. (2015a). Evolutionary insight from whole-genome sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol.* 10, 599–611. doi:10.2217/fmb.15.3.
- Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S., and Johansen, H. K. (2015b). Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 47, 57–64. doi:10.1038/ng.3148.
- Meybeck, A., and Fantin, B. (2004). De la colonie microbienne à l'infection chez l'homme : le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, importance thérapeutique. *Antibiotiques* 6, 241–248. doi:10.1016/S1294-5501(04)94271-9.
- Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., and Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. World J. Microbiol. Biotechnol. 35, 178. doi:10.1007/s11274-019-2739-1.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., and Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J. Infect. Public Health* 2, 101–111. doi:10.1016/j.jiph.2009.08.003.
- Mogro, E. G., Ambrosis, N., and Lozano, M. J. (2020). Easy identification of insertion sequence mobilization events in related bacterial strains with ISCompare. *bioRxiv*, 2020.10.16.342287. doi:10.1101/2020.10.16.342287.
- Moradali, M. F., Ghods, S., and Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 39. doi:10.3389/fcimb.2017.00039.
- Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J., et al. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Population Diversity and Turnover in Cystic Fibrosis Chronic Infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1674–1679. doi:10.1164/rccm.201009-1430OC.

- Mulder, M., Radjabzadeh, D., Hassing, R. J., Heeringa, J., Uitterlinden, A. G., Kraaij, R., et al. (2019). The effect of antimicrobial drug use on the composition of the genitourinary microbiota in an elderly population. *BMC Microbiol*. 19, 9. doi:10.1186/s12866-018-1379-1.
- Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Zamorano, L., Juan, C., et al. (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5527–5535. doi:10.1128/AAC.01481-13.
- Muthukumarasamy, U., Preusse, M., Kordes, A., Koska, M., Schniederjans, M., Khaledi, A., et al. (2020). Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genetic Diversity Analysis of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Genome Biol. Evol.* 12, 396–406. doi:10.1093/gbe/evaa059.
- Newman, J. W., Floyd, R. V., and Fothergill, J. L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. doi:10.1093/femsle/fnx124.
- Ogunnariwo, J., and Hamilton-Miller, J. M. T. (1975). Brown- and Red-Pigmented *Pseudomonas Aeruginosa*: Differentiation Between Melanin and Pyorubrin. J. Med. *Microbiol.* 8, 199–203. doi:10.1099/00222615-8-1-199.
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., and Jehl, F. (2019). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* 10, 2894. doi:10.3389/fmicb.2019.02894.
- Oliveira, D. M. P. D., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., et al. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. doi:10.1128/CMR.00181-19.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251–1254.
- Oliver, A., and Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 798–808. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03250.x.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., and Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 21–22, 41–59. doi:10.1016/j.drup.2015.08.002.
- ONERBA (2018). Rapport d'activité 2017. Available at: http://onerbadoc.onerba.org/Rapports/Rapport-ONERBA-2017/ONERBA_rapport_2017.pdf [Accessed April 24, 2019].
- Osawa, K., Shigemura, K., Kitagawa, K., Fukuda, T., Takasaka, A., Wakabayashi, S., et al. (2019). Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine in Hyogo, Japan. *Int. J. Urol.* 26, 127–133. doi:10.1111/iju.13818.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. J. Vis. Exp., 2437. doi:10.3791/2437.

- Ozer, E. A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R. J., and Hauser, A. R. (2019). The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of exoU+ and exoS+ Lineages. *Genome Biol. Evol.* 11, 1780–1796. doi:10.1093/gbe/evz119.
- Pachori, P., Gothalwal, R., and Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 6, 109– 119. doi:10.1016/j.gendis.2019.04.001.
- Panayidou, S., Georgiades, K., Christofi, T., Tamana, S., Promponas, V. J., and Apidianakis, Y. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growthindependent control on virulence. *Sci. Rep.* 10, 9505. doi:10.1038/s41598-020-66194-4.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., and Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37, 177–192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- Parkins, M. D., Somayaji, R., and Waters, V. J. (2018). Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 31. doi:10.1128/CMR.00019-18.
- Peña, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., et al. (2015). Influence of Virulence Genotype and Resistance Profile in the Mortality of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Clin. Infect. Dis.* 60, 539–548. doi:10.1093/cid/ciu866.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., and Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7563–7568. doi:10.1073/pnas.1502025112.
- Pestrak, M. J., Chaney, S. B., Eggleston, H. C., Dellos-Nolan, S., Dixit, S., Mathew-Steiner, S. S., et al. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants evade host clearance, are hyper-inflammatory, and persist in multiple host environments. *PLOS Pathog.* 14, e1006842. doi:10.1371/journal.ppat.1006842.
- Plaza, J. J. G. (2020). Small RNAs as Fundamental Players in the Transference of Information During Bacterial Infectious Diseases. *Front. Mol. Biosci.* 7. doi:10.3389/fmolb.2020.00101.
- Pobiega, M., Maciąg, J., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Pomorska-Wesolowska, M., Ziolkowski, G., et al. (2015). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infections in Southern Poland. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 295–297. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.022.
- Pobiega, M., Wojkowska-Mach, J., Maciag, J., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Pomorska-Wesolowska, M., et al. (2014). Virulence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Southern Poland. *Chemotherapy* 60, 253–260. doi:10.1159/000376569.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob.* Agents Chemother. 49, 479–487. doi:10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.

- Poole, K. (2011). *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00065.
- Qin, X., Zhou, C., Zerr, D. M., Adler, A., Addetia, A., Yuan, S., et al. (2018). Heterogeneous Antimicrobial Susceptibility Characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *mSphere* 3. doi:10.1128/mSphere.00615-17.
- Raman, G., Avendano, E. E., Chan, J., Merchant, S., and Puzniak, L. (2018). Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7, 79. doi:10.1186/s13756-018-0370-9.
- Rani, A., Ranjan, R., McGee, H. S., Andropolis, K. E., Panchal, D. V., Hajjiri, Z., et al. (2017). Urinary microbiome of kidney transplant patients reveals dysbiosis with potential for antibiotic resistance. *Transl. Res.* 181, 59–70. doi:10.1016/j.trsl.2016.08.008.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Res. Int.* doi:10.1155/2015/759348.
- Rau, M. H., Marvig, R. L., Ehrlich, G. D., Molin, S., and Jelsbak, L. (2012). Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environ. Microbiol.* 14, 2200–2211. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02795.x.
- Reichhardt, C., and Parsek, M. R. (2019). Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00677.
- Reitzer, L., and Zimmern, P. (2019). Rapid Growth and Metabolism of Uropathogenic Escherichia coli in Relation to Urine Composition. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. doi:10.1128/CMR.00101-19.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J. Infect. Dis. 197, 1079–1081. doi:10.1086/533452.
- Riquelme, S. A., Wong Fok Lung, T., and Prince, A. (2020). Pulmonary Pathogens Adapt to Immune Signaling Metabolites in the Airway. *Front. Immunol.* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00385.
- Rodríguez-Rojas, A., Mena, A., Martín, S., Borrell, N., Oliver, A., and Blázquez, J. (2009). Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 1050–1057. doi:10.1099/mic.0.024745-0.
- Römling, U., Kader, A., Sriramulu, D. D., Simm, R., and Kronvall, G. (2005). Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ. Microbiol.* 7, 1029–1038. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00780.x.

- Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S., and Harjai, K. (2014). Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 5, 125–134.
- SF2H, SPILF, and AFU (2015). Révision des recommandations de bonne pratique pour la prise en charge et la prévention des Infections Urinaires Associées aux Soins (IUAS) de l'adulte. Available at: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/Recos/2015-RPCinfections urinaires associees aux soins.pdf [Accessed December 12, 2018].
- Sherrard, L. J., Tai, A. S., Wee, B. A., Ramsay, K. A., Kidd, T. J., Ben Zakour, N. L., et al. (2017). Within-host whole genome analysis of an antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain sub-type in cystic fibrosis. *PloS One* 12, e0172179. doi:10.1371/journal.pone.0172179.
- Snyder, L. A., Loman, N. J., Faraj, L. J., Levi, K., Weinstock, J., Boswell, T. C., et al. (2013). Epidemiological investigation of '*Pseudomonas aeruginosa*' isolates from a six-yearlong hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. *Eurosurveillance* 18. Available at: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.42.20611 [Accessed April 2, 2019].
- Soares, A., Alexandre, K., and Etienne, M. (2020). Tolerance and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.02057.
- Société Française de Microbiologie (2018). "Référentiel en microbiologie médicale. Infections urinaires," in *REMIC : Société Française de Microbiologie*, 181–197.
- Sousa, A. M., Monteiro, R., and Pereira, M. O. (2018). Unveiling the early events of *Pseudomonas aeruginosa* adaptation in cystic fibrosis airway environment using a long-term in vitro maintenance. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 1053–1064. doi:10.1016/j.ijmm.2018.10.003.
- SPILF (2015). Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte. Available at: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/infections-urinaires-spilfargumentaire.pdf.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964. doi:10.1038/35023079.
- Sullivan, C. B., Diggle, M. A., and Clarke, S. C. (2005). Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol. Biotechnol.* 29, 245–254. doi:10.1385/MB:29:3:245.
- Sun, Q., Ba, Z., Wu, G., Wang, W., Lin, S., and Yang, H. (2016). Insertion sequence ISRP10 inactivation of the *oprD* gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 375–379. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.008.

- Suzuki, T., Okamoto, S., Oka, N., Hayashi, N., Gotoh, N., and Shiraishi, A. (2018). Role of *pvdE* Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *Cornea* 37, S99. doi:10.1097/ICO.00000000001728.
- Tai, A. S., Bell, S. C., Kidd, T. J., Trembizki, E., Buckley, C., Ramsay, K. A., et al. (2015). Genotypic Diversity within a Single *Pseudomonas aeruginosa* Strain Commonly Shared by Australian Patients with Cystic Fibrosis. *PloS One* 10, e0144022. doi:10.1371/journal.pone.0144022.
- Thöming, J. G., Tomasch, J., Preusse, M., Koska, M., Grahl, N., Pohl, S., et al. (2020).
 Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *Npj Biofilms Microbiomes* 6, 1–13. doi:10.1038/s41522-019-0113-6.
- Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., et al. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 301, 282–292. doi:10.1016/j.ijmm.2010.10.005.
- Tielen, P., Rosin, N., Meyer, A.-K., Dohnt, K., Haddad, I., Jänsch, L., et al. (2013). Regulatory and Metabolic Networks for the Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Urinary Tract-Like Conditions. *PLOS ONE* 8, e71845. doi:10.1371/journal.pone.0071845.
- Tielen, P., Wibberg, D., Blom, J., Rosin, N., Meyer, A.-K., Bunk, B., et al. (2014). Genome Sequence of the Small-Colony Variant *Pseudomonas aeruginosa* MH27, Isolated from a Chronic Urethral Catheter Infection. *Genome Announc* 2, e01174-13. doi:10.1128/genomeA.01174-13.
- Tierney, A. R., and Rather, P. N. (2019). Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 14, 533–552. doi:10.2217/fmb-2019-0002.
- Tolker-Nielsen, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS. Suppl.*, 1–51. doi:10.1111/apm.12335.
 - Treepong, P., Guyeux, C., Meunier, A., Couchoud, C., Hocquet, D., and Valot, B. (2018). panISa: ab initio detection of insertion sequences in bacterial genomes from short read sequence data. *Bioinformatics* 34, 3795–3800. doi:10.1093/bioinformatics/bty479.
- Treepong, P., Kos, V. N., Guyeux, C., Blanc, D. S., Bertrand, X., Valot, B., et al. (2017). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.cmi.2017.06.018.
- Valentini, M., and Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J. Biol. Chem.* 291, 12547–12555. doi:10.1074/jbc.R115.711507.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., and Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Opin. Microbiol.* 41, 15–20. doi:10.1016/j.mib.2017.11.006.

- Valot, B., Rohmer, L., Jacobs, M. A., Miller, S. I., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2014). Comparative Genomic Analysis of Two Multidrug-Resistant Clinical Isolates of ST395 Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Obtained 12 Years Apart. *Genome Announc* 2, e00515-14. doi:10.1128/genomeA.00515-14.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., and Houdt, R. V. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 709–730. doi:10.1080/1040841X.2017.1303661.
- Varin, A., Valot, B., Cholley, P., Morel, C., Thouverez, M., Hocquet, D., et al. (2017). High prevalence and moderate diversity of *Pseudomonas aeruginos*a in the U-bends of high-risk units in hospital. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220, 880–885. doi:10.1016/j.ijheh.2017.04.003.
- Venier, A.-G., Lavigne, T., Jarno, P., L'heriteau, F., Coignard, B., Savey, A., et al. (2012). Nosocomial urinary tract infection in the intensive care unit: when should *Pseudomonas aeruginosa* be suspected? Experience of the French national surveillance of nosocomial infections in the intensive care unit, Rea-Raisin. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E13–E15. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03686.x.
- Vorhölter, F.-J., Tielen, P., Wibberg, D., Narten, M., Schobert, M., Tüpker, R., et al. (2015). Genome Sequence of the Urethral Catheter Isolate *Pseudomonas aeruginosa* MH19. *Genome Announc* 3, e00115-15. doi:10.1128/genomeA.00115-15.
- Wagenlehner, F. M. E., Cek, M., Naber, K. G., Kiyota, H., and Bjerklund-Johansen, T. E. (2012). Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. *World J. Urol.* 30, 59–67. doi:10.1007/s00345-011-0757-1.
- Waine, D. J., Honeybourne, D., Smith, E. G., Whitehouse, J. L., and Dowson, C. G. (2009). Cross-sectional and longitudinal multilocus sequence typing of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3444–3448. doi:10.1128/JCM.00459-09.
- Wardell, S. J. T., Rehman, A., Martin, L. W., Winstanley, C., Patrick, W. M., and Lamont, I. L. (2019). A Large-Scale Whole-Genome Comparison Shows that Experimental Evolution in Response to Antibiotics Predicts Changes in Naturally Evolved Clinical *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother.* 63. doi:10.1128/AAC.01619-19.
- Wee, B. A., Tai, A. S., Sherrard, L. J., Ben Zakour, N. L., Hanks, K. R., Kidd, T. J., et al. (2018). Whole genome sequencing reveals the emergence of a *Pseudomonas aeruginosa* shared strain sub-lineage among patients treated within a single cystic fibrosis centre. *BMC Genomics* 19, 644. doi:10.1186/s12864-018-5018-x.
- Welker, Y. (2017). Le pyocyanique dans tous ses états. Available at: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/jra/jra-2017/jra2017-welker.pdf [Accessed May 24, 2019].
- Wibberg, D., Tielen, P., Blom, J., Rosin, N., Schobert, M., Tüpker, R., et al. (2014). Genome Sequence of the Acute Urethral Catheter Isolate *Pseudomonas aeruginosa* MH38. *Genome Announc*. 2. doi:10.1128/genomeA.00161-14.

- Wibberg, D., Tielen, P., Narten, M., Schobert, M., Blom, J., Schatschneider, S., et al. (2015). Genome Sequence of the Urethral Isolate *Pseudomonas aeruginosa* RN21. *Genome Announc* 3, e00788-15. doi:10.1128/genomeA.00788-15.
- Williams, D., Evans, B., Haldenby, S., Walshaw, M. J., Brockhurst, M. A., Winstanley, C., et al. (2015). Divergent, coexisting *Pseudomonas aeruginosa* lineages in chronic cystic fibrosis lung infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 775–785. doi:10.1164/rccm.201409-1646OC.
- Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M. A. (2016). Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. Trends Microbiol. 24, 327–337. doi:10.1016/j.tim.2016.01.008.
- Wolfe, A. J., and Brubaker, L. (2015). "Sterile Urine" and the Presence of Bacteria. *Eur. Urol.* 68, 173–174. doi:10.1016/j.eururo.2015.02.041.
- World Health Organization (2018). L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. *World Health Organ*. Available at: http://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed [Accessed July 2, 2018].
- Yabuuchi, E., and Ohyama, A. (1972). Characterization of "Pyomelanin"-Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 22, 53–64. doi:10.1099/00207713-22-2-53.
- Zebouh, M., Thomas, C., Honderlick, P., Lemee, L., Segonds, C., Wallet, F., et al. (2008). Direct antimicrobial susceptibility testing method for analysis of sputum collected from patients with cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. 7, 238–243. doi:10.1016/j.jcf.2007.10.002.
- Zhang, X., Niu, S., and Zhang, L. (2014). Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Urinary Tract Infections. Urol. Int. 93, 464–469. doi:10.1159/000358493.
Résumé / Abstract

Diversité phénotypique et moléculaire d'isolats urinaires de Pseudomonas aeruginosa

Nos travaux ont exploré la diversité phénotypique (sensibilité aux antibiotiques) et génétique (*MultiLocus Sequence Typing* et *Whole Genome Sequencing*) d'isolats urinaires de *P. aeruginosa.* Nous avons étudié la diversité intra-prélèvement, *via* l'étude de multiples isolats par échantillon collectés chez 120 patients présentant une infection urinaire (40) ou une bactériurie asymptomatique (80) à *P. aeruginosa.* En parallèle, la diversité au cours du temps a été étudiée chez des isolats collectés chez 7 patients sur une période de 48 à 488 jours.

Les patients étaient le plus souvent colonisés ou infectés par un seul génotype ou *clone type*, bien qu'une diversité phénotypique (28% des patients) et génotypique (4% des patients) ait été identifiée pour la première fois au sein d'un même prélèvement, à l'origine d'infections ou de colonisations polyclonales. Par ailleurs, des mutations et/ou de larges délétions génomiques ont été identifiées au cours du temps, principalement au sein de gènes codant des régulateurs transcriptionnels, des systèmes à deux composants ou impliqués dans le catabolisme du carbone. En parallèle des changements génomiques, des modifications phénotypiques affectant le fitness et la capacité des isolats à former du biofilm ont été observées.

Ainsi, la diversité phénotypique et génétique intra-hôte doit être prise en compte pour parfaire le diagnostic et le traitement des infections urinaires à *P. aeruginosa*.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, infections urinaire, épidémiologie, résistance aux antibiotiques, diversité génétique, adaptation, infections polyclonales

Phenotypic and molecular diversity of Pseudomonas aeruginosa urinary isolates

The aim of this study was to explore phenotypic (antimicrobial resistance) and genetic diversity (MultiLocus Sequence Typing and Whole Genome Sequencing) of *P. aeruginosa* urinary isolates. Thus, we have studied (i) within-sample diversity (several isolates analyzed per urine sample) of urinary isolates collected from 120 patients with urinary tract infection (40) or asymptomatic bacteriuria (80), and (ii) *P. aeruginosa* within-host evolution for 7 patients with successive urine samples (from 48 to 488 days apart).

Even though patients were mostly colonized or infected by a given clone, this is the first study to identify within-sample phenotypic (28% of patients) and genotypic (4% of patients) diversity, and thus polyclonal bacteriuria. *P. aeruginosa* adaptation to the urinary tract was mostly driven by mutations and/or large genomic deletions, particularly in genes encoding transcriptional regulators, two component systems and carbon compound catabolism. Genomic adaptation was associated with phenotypic changes in terms of biofilm formation and fitness.

Thus, phenotypic and genetic within-host diversity should be taken into account in the diagnosis and treatment of *P. aeruginosa* urinary tract infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, urinary isolates, epidemiology, antimicrobial resistance, genetic diversity, within-host adaptation, polyclonal infections