



Étude du rôle et de l'évolution de la production de sidérophores sur l'interaction entre *Pseudomonas* *aeruginosa* et différents pathogènes dans le contexte de la mucoviscidose

Gwenaëlle Graulier

► To cite this version:

Gwenaëlle Graulier. Étude du rôle et de l'évolution de la production de sidérophores sur l'interaction entre *Pseudomonas aeruginosa* et différents pathogènes dans le contexte de la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ018 . tel-03726503

HAL Id: tel-03726503

<https://theses.hal.science/tel-03726503v1>

Submitted on 18 Jul 2022

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

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
UMR7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

Présentée par :

Gwenaëlle GRAULIER

Soutenue le : **11 mars 2022**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la Biologie

**Etude du rôle et de l'évolution de la production de
sidérophores sur l'interaction entre *Pseudomonas
aeruginosa* et différents pathogènes dans le contexte
de la mucoviscidose**

THÈSE dirigée par :

Dr Pierre FECHTER

Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr Romé VOULHOUX

Université d'Aix-Marseille

Pr Karen MOREAU

Université Claude Bernard Lyon I

EXAMINATEURS :

Dr Antoine GRILLON

Université de Strasbourg

Pr Hélène MARCHANDIN

Université de Montpellier

INVITÉS :

Dr Isabelle SCHALK

Université de Strasbourg

Dr Laurence CHOULIER

Université de Strasbourg

Remerciements

Depuis la première au lycée, je suis tombée amoureuse de la microbiologie. Quelle satisfaction d'arriver au bout du parcours, d'aller le plus loin possible dans les études dans ce domaine fantastique de la recherche en microbiologie. Et pourtant, j'ai martelé d'innombrables fois que je ne ferais pas de thèse, jusqu'au jour même de ma soutenance de master. Mais finalement, l'aventure me tendait les bras et me faisait envie. Il suffisait juste d'oser. On peut dire qu'en de nombreux points cette thèse a été particulière... Je pense bien sûr au contexte COVID, mais aussi à une grossesse et un début de parentalité qui ont fait passer le déroulement de cette thèse d'un « long fleuve tranquille » à un « torrent de montagne ». Cette thèse a été un travail très personnel, rempli de difficultés mais également de nombreux moments de satisfactions. Mais ce fut aussi et surtout un travail d'équipe, car sans être entourée comme je le fut, je ne serais jamais arrivée au bout de l'aventure. C'est pourquoi, je tiens à adresser des remerciements à toutes les personnes qui de près (voir de très près), ou de loin, ont participé à ce projet.

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de soutenance, le Dr Antoine Grillon, la Pr Hélène Marchandin, la Pr Karen Moreaux et le Dr Romé Voulhoux pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci également aux Drs Laurence Choulier et Isabelle Schalk d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'invitées.

Je remercie énormément Pierre, mon directeur de thèse. Lors de mes hésitations à dire oui à la thèse, une personne m'a dit que la chose la plus importante pour se lancer dans une thèse était d'avoir un bon feeling avec son futur encadrant et donc, j'ai suivi ce conseil. Merci pour ton soutien, de la préparation du concours de l'ED jusqu'à la fin de la rédaction. Merci pour tes conseils et ta bienveillance. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme, même avec des résultats parfois vraiment tentaculaires ! Merci de m'avoir laissé une grande liberté dans ce projet, le transformant ainsi en **un réel travail en binôme**.

Je remercie également Isabelle et Gaëtan de m'avoir accepté au sein de l'équipe MMBCA. Merci Isabelle, de m'avoir fourni dès la sortie de mon master mon premier emploi, sans lequel, je n'aurais finalement jamais commencé de thèse. Merci Gaëtan pour ta bienveillance, ton humour et tes réponses à toutes mes questions de chimie (souvent bêtes...).

Je remercie à nouveau Antoine et Laurence pour leur accompagnement durant ces 3,5 ans de thèse en faisant parti de mon Comité de Suivi de Thèse. Vos conseils et remarques furent précieux et sans eux certains résultats de ce travail n'existeraient tout simplement pas.

Un grand merci également à Anne et Régine. Merci pour votre aide si précieuse dans les manips. Merci Anne pour tes beaux mutants et ta douceur, merci Régine d'avoir 'pris le relais' pendant quelques semaines, tes minutieuses relectures et ta gentillesse. Grâce à votre aide cette thèse est devenue **un vrai travail d'équipe**.

Merci à Valérie pour ta bonne humeur. Merci également il y a maintenant plus de 5 ans de m'avoir fait faire un stage de M1 dans l'équipe. Après tout, sans ce stage, tout cela ne serait jamais arrivé.

En parlant d'équipe, un grand merci à tous les membres de la team MMBCA. Merci Véronique d'avoir répondu et résolu mes nombreuses questions de biomol et de m'avoir formée à mon arrivée. Merci à Françoise pour ton énergie et ton aide en chimie. Merci à Coraline pour tes conseils et ta bonne humeur. Merci à Olivier pour tes conseils également et le tuyau 'inkscape' sans lequel les figures de ce manuscrit ne seraient pas aussi belles. Merci à mes petits zozos : Aline, Hélène, Marion, Thibaut, Virginie et Sarah ; je dois vous avouer que parfois pendant la rédaction, je venais exprès pour voir vos petites têtes et profiter de vous le temps d'un midi.

Merci également aux anciens membres de l'équipe, Anne, Béatrice, Mathilde, Sebou, Vincent ; et en particulier Quentin qui m'a formé à mon arrivée et pour ton manuscrit qui m'a (beaucoup) aidé pour ma rédaction.

Merci à ma stagiaire de BTS, Deniz, qui m'a bien aidé au début de ma thèse dans la caractérisation de la collection des isolats cliniques.

Un grand merci également à Pascaline et Isabelle C, qui durant 2 ans m'ont permis de faire partie des moniteurs de 'tech bio'. J'ai trouvé cette expérience d'enseignement plus qu'enrichissante, de là à hésiter fortement à me lancer à cœur perdu dans cette voie.

Un énorme merci au Dr Nina Cramer qui nous a fourni cette collection d'isolats cliniques de *Pseudomonas* et au Dr Anne Doléans-Jordheim pour la collection de compétitrices, sans qui ce projet n'existerait tout simplement pas. Merci également aux Drs Raphaël Recht et Dalal Werner d'Aérial pour leurs analyses de RMN sur nos surnageants, je suis sûre que cela va donner de beaux résultats pour le papier. Et Merci à Lauriane Kuhn pour les analyses de protéomiques qui nous ont permis d'expliquer beaucoup d'observations.

Je tiens également à remercier Sabine, ma directrice de stage de M2. Après tout, c'est vous qui avez planté en moi la petite graine d'amour de la recherche. Je me souviendrais toujours avec affection de ce stage, de nos échanges et de mon séjour lyonnais. Sans vous, je n'aurais jamais eu l'idée d'accepter de faire une thèse.

Je tiens également à remercier mes parents. C'est vous qui m'avez permis de faire les études que je voulais. Vous m'avez toujours encouragée et m'avez donné tous les moyens de m'épanouir dans ma voie. Et puis merci pour tout, tout simplement. Merci également à mes grands-parents, votre soutien et votre intérêt pour ma thèse sont une petite bulle de fraîcheur. Merci également à tout le reste de ma famille et à ma belle-famille, j'ai de la chance d'être entourée comme ça.

Merci également à mes amis, car une thèse sans moments d'aparté, ce serait bien trop difficile. Merci mon petit Sebou (encore une fois), pour toutes nos longues discussions face à la fenêtre du bureau, ça fait du bien d'avoir quelqu'un qui voit les choses de la même façon. Merci Sarah (encore une fois) & Billy, pour nos supers aventures JDR, qui ne sont pas prêtes de s'arrêter. Merci Jules, Lucie et Olivier de me supporter depuis la L3, sans vous, votre soutien et nos sessions BU je n'en serais clairement pas là. Et merci Muriel et Tiphany de le faire depuis le collège, voir la primaire ! Merci à Alexia & Simon, nos 'collègues jeunes parents'. Merci aussi à Audrey, Léa et Marjorie, on finira par y arriver à prendre nos thés (et un café !) toutes ensemble en même temps.

Bien sûr, et surtout, merci à mon binôme de la vie, Meïven. Merci pour ton soutien, durant toutes mes études pleines de stress (et dieu sait que tu en as bavé), mais également quand je t'ai dit que je finalement si, je voulais faire une thèse ce qui a bouleversé nos projets et bien sûr, durant ces 3 ans et demi. Merci pour tout amour, ta douceur et ton implication. Grandir, mûrir, devenir une adulte puis une maman (et bientôt une docteur !) à tes côtés n'est que le début de l'aventure !

Enfin, je tiens à remercier ma petite bulle de douceur, Alyssandre. Tu ne liras peut-être jamais ces lignes, ou alors dans très longtemps, mais sache que ta venue dans ma vie est la plus belle chose qui me soit arrivée. Je n'ai à aucun moment regretté de t'avoir en plein milieu de ma thèse, et je pense que grâce à toi, je l'ai vécue avec bien plus de maturité, de recul et de sagesse.

« Cette voie doit être suivie, mais elle sera très ardue. Et ni la force, ni la sagesse ne nous conduiront bien loin sur elle. Dans cette quête, les faibles ont autant d'espoir que les forts. Mais il en va souvent ainsi des actes qui font tourner les roues du monde : de petites mains s'en chargent parce qu'il le faut, pendant que les yeux des grands regardent ailleurs. »

- La fraternité de l'anneau, J. R. R. Tolkien

Table des matières

Liste des figures et tableaux

Liste des abréviations

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : La place du fer dans l'infection

1. Utilité biologique du fer et inconvénients.....	1
2. L'homéostasie du fer chez l'homme.....	2
2.1. Formes du fer et disponibilité dans le corps humain	2
2.2. L'immunité nutritionnelle, la défense de l'hôte dans la bataille pour le fer	3
3. Contre-attaque des bactéries, les systèmes bactériens d'import du fer.....	4
3.1. Utilisation de l'hème et des hémoprotéines	5
3.2. Utilisation de la transferrine et de la lactoferrine	7
3.3. Utilisation du fer(II)	8
3.4. L'arme fatale pour l'acquisition du fer : les sidérophores	9

Chapitre II : Les infections bactériennes pulmonaires dans le cas de la mucoviscidose

1. La mucoviscidose.....	14
1.1. Une maladie génétique aux nombreuses conséquences	14
1.2. Etat du fer dans la mucoviscidose	16
2. Les infections pulmonaires dans le cas de la mucoviscidose.....	16
3. Traitements antibiotiques administrés dans le cadre de la mucoviscidose.....	20

Chapitre III : *Pseudomonas aeruginosa*

1. Généralités sur <i>P. aeruginosa</i>	21
2. Les sidérophores de <i>P. aeruginosa</i>	22
2.1. La pyoverdine.....	22
2.2. La pyochéline	25
3. Autres voies d'import du fer chez <i>P. aeruginosa</i>	27
3.1. Utilisation de l'hème et des protéines chélatrices de fer de l'hôte.....	27

3.2.	Utilisation d'exosidérophores	29
3.3.	Utilisation du fer ferreux	30
4.	Pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i> dans le cadre de la mucoviscidose	30
4.1.	Primo-colonisation et infection aiguë	30
4.2.	Evolution dans l'environnement pulmonaire et colonisation chronique.....	33
5.	La résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i>	36
5.1.	Mécanismes d'antibiorésistance	36
5.2.	Alternatives à l'antibiorésistance, stratégie du cheval de Troie et phagothérapie.....	38
1.	Interactions avec le microbiote pulmonaire	41
2.	Interactions avec les autres pathogènes pulmonaires	42
2.1.	Les champignons <i>Candida</i> et <i>Aspergillus</i>	42
2.2.	La bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	44
2.3.	Les membres du <i>Burkholderia cepacia</i> complex	47
2.4.	Les pathogènes dits 'émergents'.....	49
2.4.1.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50
2.4.2.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	51
3.	Les interactions intra-espèce	52
	Objectifs de la thèse	54

Partie II : Résultats expérimentaux

Chapitre I : Vers une meilleure compréhension du rôle de la pyochéline dans l'infection

1.	Résumé de l'article	56
2.	Résultats détaillés présentés sous forme d'un article publié	58

Chapitre II : Construction de mutants de *P. aeruginosa* exprimant constitutivement un marqueur fluorescent inséré dans le chromosome

1.	Résumé de l'article	59
2.	Résultats détaillés présentés sous forme d'un article en préparation pour soumission	60

Chapitre III : Caractérisation physiologique d'une collection d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* et de bactéries compétitrices

1.	Introduction.....	61
2.	Caractérisation de la collection d'isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	61
2.1.	Etablissement de courbes de croissance.....	61
2.2.	Production de sidérophores.....	62
2.3.	Evaluation de la production de biofilm des lignées longitudinales.....	65
2.4.	Etude de la mobilité	66
2.5.	Antibiogrammes.....	67
2.6.	Caractérisation de la PVD.....	69
3.	Caractérisation plus poussée de la lignée B	69
3.1.	Historique de la lignée	69
3.2.	Comportement de la lignée dans le milieu choisi.....	70
3.3.	Effet de l'ajout de PVD sur la croissance de l'isolat B25	73
3.4.	Analyse protéomique	74

Chapitre IV : Interactions de *P. aeruginosa* avec d'autres bactéries pathogènes - focus sur le rôle de ses sidérophores

1.	Pouvoir chélateur des différentes bactéries	77
2.	Etude de l'impact du sécrétome sur la compétition entre bactéries.....	78
2.1.	Effet des surnageants de bactéries compétitrices sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i> et sa production de sidérophores.....	78
2.2.	Effet du surnageant de <i>P. aeruginosa</i> sur la croissance de bactéries compétitrices	82
2.3.	Etude des interactions entre <i>P. aeruginosa</i> et les compétitrices en contact direct	84
2.4.	Lignes de discussions dégagées suite à ces résultats	87
3.	Expérimentations complémentaires	90
3.1.	Investigation de l'effet positif de la pyoverdine sur <i>A. xylosoxidans</i>	90
3.2.	Utilisation d'autres souches des bactéries compétitrices.....	93
3.3.	Effet du surnageant de différentes lignées de Pa cliniques sur toute la collection de compétitrices	95

Chapitre V : Recherche d'un lien entre l'évolution de la production de sidérophores et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques durant l'infection chronique

1. Introduction.....	98
2. Détermination des CMI.....	99
3. Co-cultures en présence d'antibiotiques.....	102
3.1. Co-cultures sur 10 jours en présence de concentration sub-inhibitrice d'antibiotiques	102
3.2. Utilisation du gradient de Szybalski	105

Partie III : Discussion et conclusion

Discussion et conclusions	108
---------------------------------	-----

Partie IV : Matériel et Méthodes

1. Collection de souches bactériennes	115
2. Milieux de culture et préparation des cultures	117
3. Suivis de croissance bactérienne avec surnageants de culture.....	118
4. Dosage des sidérophores	119
5. Dosage de la production de biofilm	119
6. Etude de la mobilité.....	120
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	120
8. Caractérisation de la PVD par IEF.....	120
9. Analyses protéomiques	121
10. Analyses transcriptomiques par RT-qPCR.....	121
11. Evaluation de l'activité chélatrice relative d'un composé par test du CAS	122
12. Préparation des surnageants de culture.....	122
13. Production et purification de sidérophores.....	123
14. Création d'isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i> contenant un tag fluorescent.....	123
15. Co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices	124
16. Suivi de croissance d'Ax en présence de PVD.....	124
17. Suivi de fluorescence de la PVD	125

18. Etude de l'effet du surnageant de différentes lignées de Pa sur une collection de compétitrices	125
19. Co-cultures de différents mutants de Pa en présence d'une pression ATB sur 10 jours	125
20. Sélection de mutants résistants aux ATB par la méthode du gradient de Szybalski.....	126
Bibliographie	128
Annexes	
Contributions dans d'autres publications scientifiques.....	149
Article 1.....	149
Article 2.....	150
Article 3.....	151
Monitorat	152
Communications sur le projet de thèse	153
Publications	153
Communications orales.....	153
Communication par affiche.....	153

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Cycle simplifié de l'homéostasie du fer chez l'homme.....	3
Figure 2 : La molécule d'hème et la protéine d'hémoglobine.....	5
Figure 3 : Représentation schématique d'un TBDT.....	6
Figure 4 : Représentation schématique d'un système FeoABC type.....	9
Figure 5 : Formule de différents sidérophores.....	10
Figure 6 : Représentation schématique des différents types de voies d'acquisition des sidérophores.....	11
Figure 7 : Représentation schématique des interactions hôte-pathogènes pour l'acquisition du fer.....	13
Figure 8 : Représentation schématique de transporteurs CFTR fonctionnels (gauche) et non fonctionnels (droite) ainsi que liste des symptômes les plus souvent associés à la mucoviscidose.....	15
Figure 9 : Evolution des pathogènes bactériens retrouvés dans les poumons des patients CF en fonction de l'âge.....	17
Figure 10 : Formule chimique de la PVD de type I de Pa PAO1.....	22
Figure 11 : Représentation schématique de la voie PVD.....	24
Figure 12 : Formule chimique de la PCH.....	26
Figure 13 : Représentation schématique de la voie PCH.....	27
Figure 14 : Représentation schématiques des voies de d'acquisition de l'hème chez Pa.....	28
Figure 15 : Exemples de facteurs de virulence exprimés lors des phases d'infection aiguë à Pa....	31
Figure 16 : Formule chimique de la pyocyanine.....	32
Figure 17 : Représentation schématique de l'influence de PvdS sur les différents aspects de la biologie de Pa.....	33
Figure 18 : Evolution de l'infection à Pa dans le cadre des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de CF.....	34
Figure 19 : Représentation schématique des étapes de la formation d'un biofilm chez Pa.....	36
Figure 20 : Représentation schématique des différentes stratégie d'antibiorésistance chez Pa.....	37

Figure 21 : Représentation schématique de la stratégie du cheval de Troie et première molécule de ce type commercialisée.....	39
Figure 22 : Représentation schématique des interactions de Pa avec les champignons.....	44
Figure 23 : Formules chimiques des sidérophores de Sa.....	45
Figure 24 : Représentation schématique des interactions entre Pa et Sa.....	46
Figure 25 : Formules chimiques de sidérophores présents chez les membres du Bcc.....	48
Figure 26 : Représentation schématique des interactions entre Pa et un membre du Bcc.....	49
Figure 27 : Représentation schématique des interactions entre Pa et Sm.....	51
Figure 28 : Représentation schématique de la boucle d'auto-activation des sidérophores chez Pa.....	57
Figure 29 : Suivi de croissance des isolats des différentes lignées cliniques de Pa en milieu chelex + 1 % sérum par mesure de la DO ₆₀₀	62
Figure 30 : Production de sidérophores des lignées B, E, F, G et K.....	64
Figure 31 : Dosage de la production de biofilm pour les lignées B, E, F, G et K.....	66
Figure 32 : Observation de la mobilité des lignées E, F, G et K et de la souche PAO1.....	67
Tableau 1 : CMI de la collection d'isolats cliniques vis-à-vis de différents ATB.....	68
Figure 33 : IEF de la PVD des premiers isolats des différentes lignées de la collection.....	69
Figure 34 : Arbre phylogénétique de la lignée B.....	70
Tableau 2 : Dosage de la concentration en fer dans différents milieux de culture par ICP-AES...	71
Figure 35 : DO ₆₀₀ de cultures de Pa lignée B après 7 ou 24 h de croissance.....	72
Figure 36 : Comparaison de la production de sidérophores de la lignée B en milieu MH chelex avec/sans sérum.....	73
Figure 37 : Suivi de la croissance des isolats de la lignée B en milieu MH chelex + 1 % sérum par mesure de la DO ₆₀₀	74
Figure 38 : Variations du protéome chez les isolats de la lignée B.....	75
Figure 39 : Variation du nombre de transcrits entre les différents isolats de la lignée B par RT-qPCR.....	76
Figure 40 : Compétition pour le fer entre CAS et surnageants de culture des bactéries.....	78
Figure 41 : Effet des surnageants des bactéries compétitrices sur la lignée B de Pa.....	79

Figure 42 : Effet de l'ajout de PVD sur la croissance de la souche B25 en présence des surnageants de compétitrices.....	81
Figure 43 : Effet des surnageants des souches de la lignée B de Pa sur la croissance des bactéries compétitrices.....	83
Figure 44 : Croissance des bactéries compétitrices en présence de sidérophores purifiés.....	84
Figure 45 : Résultats des co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices au ratio 1-1.....	85
Figure 46 : Résultats des co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices au ratio 1-50.....	86
Figure 47 : Récapitulatif des effets des sidérophores de Pa sur les bactéries compétitrices.....	88
Figure 48 : Croissance d'Ax en présence de différentes concentrations de PVD.....	91
Figure 49 : Suivi de fluorescence de la PVD pendant la croissance d'Ax.....	92
Figure 50 : BLASTp de FpvA dans le génome d'Ax.....	93
Figure 51 : Croissance de la lignée B de Pa en présence du surnageants d'autres souches des bactéries compétitrices étudiées.....	94
Figure 52 : Croissances d'autres souches des bactéries compétitrices en présence des surnageants de Pa.....	95
Figure 53 : Placement des différentes bactéries de la collection sur l'arbre phylogénétique du vivant.....	96
Figure 54 : Effet des surnageants de différentes lignées de Pa cliniques sur les bactéries compétitrices.....	97
Tableau 3 : CMI pour différents ATB pour la souche PAO1 WT et ses différents mutants.....	100
Figure 55 : DO ₆₀₀ des différentes souches de PAO1 après 24 h de croissance en présence de différentes concentrations d'ATB.....	101
Figure 56 : Ratio de mutant par rapport au WT en présence ou non de tobramycine.....	103
Figure 57 : Ratio de mutant par rapport au WT en présence ou non d'ofloxacine.....	104
Figure 58 : Boîtes de gradient de Szybalski avec tobramycine.....	106
Figure 59 : Boîtes de gradient de Szybalski avec ofloxacine.....	107
Figure 60 : Représentation schématique de l'hypothèse sur la baisse de virulence.....	113
Tableau 4 : Informations concernant les isolats cliniques de Pa.....	115
Tableau 5 : Informations concernant les bactéries compétitrices.....	116
Tableau 6 : Informations concernant les souches de laboratoire de Pa.....	117

Figure 61 : Schéma explicatif de la méthode des ratios de co-cultures.....	126
Figure 62 : Préparation des boîtes contenant un gradient de Szybalski.....	127

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique

ADNc : Acide DésoxyRiboNucléique complémentaire

ADNe : Acide DésoxyRiboNucléique extracellulaire

ARN : Acide RiboNucléique

ATB : Antibiotique

Ax : *Achromobacter xylosoxidans*

Bc : *Burkholderia cepacia*

Bcc : *Burkholderia cepacia* complex

Bm : *Burkholderia multivorans*

CAA : CasAminoAcid

CAS : Chrome Azurol S

CF : *Cystic Fibrosis*, mucoviscidose

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMI50 : Concentration Minimale Inhibitrice inhibant 50 % de la croissance

DHBS : DiHydroxyBenzoylSerine

DO₆₀₀ : Densité Optique à 600 nm

DSF : *Diffusible Signal Factor*

EPS : ExoPolySaccharide

Fur : *Ferric Uptake Regulator*

IEF : Focalisation IsoElectrique

LB : *Lysogeny Broth* Lennox

LPS : LipoPolySaccharide

MDR : *Multi-Drug Resistant*

MH : Milieu Mueller-Hinton II

MH chelex : milieu Mueller-Hinton II traité à la résine chelex

NRPS : *NonRibosomal Peptide Synthetase*, synthétase à peptides non-ribosomiques

ON : *Over Night*, sur la nuit

Pa : *Pseudomonas aeruginosa*

PCH : pyochéline

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne par polymérase

PQS : *Pseudomonas Quinolone Signal*

PVD : pyoverdine

QS : Quorum Sensing

ROS : *Reactive Oxygène Species*, espèces réactives de l'oxygène

Sa : *Staphylococcus aureus*

SCV : *Small Colony Variant*

Sm : *Stenotrophomonas maltophilia*

SST4 : Système de Sécrétion de Type 4

SST6 : Système de Sécrétion de Type 6

TA : Température Ambiante

TBDT : *TonB-Dependant Transporter*, Transporteur TonB dépendant

UFC : Unités Formant Colonies

UV : UltraViolet

WT : *Wild-Type*

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

La place du fer dans l'infection

1. Utilité biologique du fer et inconvénients

Le fer est un métal essentiel à de nombreux processus biologiques et rares sont les organismes ne dépendant pas de sa présence pour leur développement. C'est grâce à ses propriétés chimiques très intéressantes et son abondance que le fer s'est imposé comme un élément indispensable à de nombreuses réactions biochimiques. En effet, le fer est le deuxième métal le plus abondant sur Terre après l'aluminium (Hans Wedepohl, 1995) et ses propriétés physico-chimiques le rendent particulièrement intéressant. Le fer a la particularité d'avoir un pouvoir redox très fort, pouvant aller de l'état (0) à (V) et une chimie de coordination très riche (Sánchez *et al.*, 2017). Les états d'oxydations les plus présents et les plus utilisés sont le fer ferreux (II) et le fer ferrique (III). Toutes ces propriétés font du fer un métal de choix dans des processus utilisant le transfert d'électrons comme la respiration cellulaire, la photosynthèse ou l'utilisation de cytochromes. Il sert également de co-facteur pour de nombreuses enzymes, notamment impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN et le fer est impliqué dans le transport de l'oxygène par exemple.

Cependant, malgré toutes ses particularités intéressantes, le fer possède également des inconvénients. En conditions aérobies et à pH physiologique le fer est retrouvé sous forme de fer(III), qui est peu soluble. Il forme alors des hydroxydes de fer, difficilement biodisponibles. De plus, sous cette forme mais également sous forme de fer(II), le fer entraîne rapidement la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species*), des molécules particulièrement réactives qui vont causer des dommages cellulaires irréversibles en réagissant avec les acides nucléiques, les acides aminés ou encore les lipides (Heli *et al.*, 2011; Hayyan *et al.*, 2016). La génération des ROS par le fer se fait *via* une réaction chimique bien décrite et particulièrement importante du fait de ses conséquences biologiques appelée réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ (Fenton, 1894).

Pour contrer cette toxicité, la présence du fer dans les cellules est très contrôlée et des protéines de stockage sont même produites pour l'emprisonner et empêcher toute réaction néfaste.

2. L'homéostasie du fer chez l'homme

2.1. Formes du fer et disponibilité dans le corps humain

Le corps humain contient en moyenne entre 3 et 5 g de fer (Mendel, 1964). La grande majorité du fer présent est retrouvé dans l'hème des protéines d'hémoglobines d'érythrocytes circulants dans le sang. Grâce à son pouvoir d'oxydation, le fer contenu dans l'hème sous forme de fer(II) va permettre la séquestration, le transport puis le relargage de l'oxygène. Le reste du fer présent dans le corps est retrouvé couplé à de la ferritine (une protéine de stockage du fer) dans les hépatocytes, dans les macrophages présents dans différents organes (foie, rate et moelle osseuse) ou lié à des protéines de transport du fer (transferrine et lactoferrine) (Mendel, 1964; Tandara and Salamunic, 2012) (Figure 1).

L'apport en fer se fait *via* l'absorption par les entérocytes durant la digestion, mais il est également recyclé après apoptose des cellules telles que les érythrocytes ou les macrophages car l'apport nutritionnel journalier n'est pas suffisant (Ganz and Nemeth, 2015). Pour éviter toute présence de fer libre dans l'organisme lors de la lyse des cellules, des protéines telles que l'albumine ou l'haptoglobine vont se lier aux hèmes, ce qui facilite également le recyclage et limite la présence de fer libre (Caza and Kronstad, 2013) (Figure 1).

La concentration en fer dans l'organisme est régulée principalement par une hormone, l'hépcidine (Figure 1). Cette dernière est synthétisée dans le foie en fonction de la concentration en fer libre et contrôle elle-même le niveau de fer libre présent dans le sang libéré à partir des hépatocytes, absorbé depuis l'intestin ou recyclé lors de l'apoptose des érythrocytes et macrophages (Ganz and Nemeth, 2015). Le principe de la régulation de la concentration en fer dans l'organisme par l'hépcidine se rapproche de celui de la régulation en glucose par l'insuline. L'hépcidine se lie à la ferroportine, un transporteur permettant l'exportation du fer depuis le cytoplasme, entraînant sa dégradation et donc empêchant la libération de fer dans le milieu extracellulaire (Finberg, 2013). La quantité de fer est aussi régulée au niveau unicellulaire par modulation de la présence des récepteurs de la transferrine, par des protéines régulatrices du fer appelées IREBP (pour *Iron-Responsive Element-Binding Protein*) (Ganz and Nemeth, 2015).

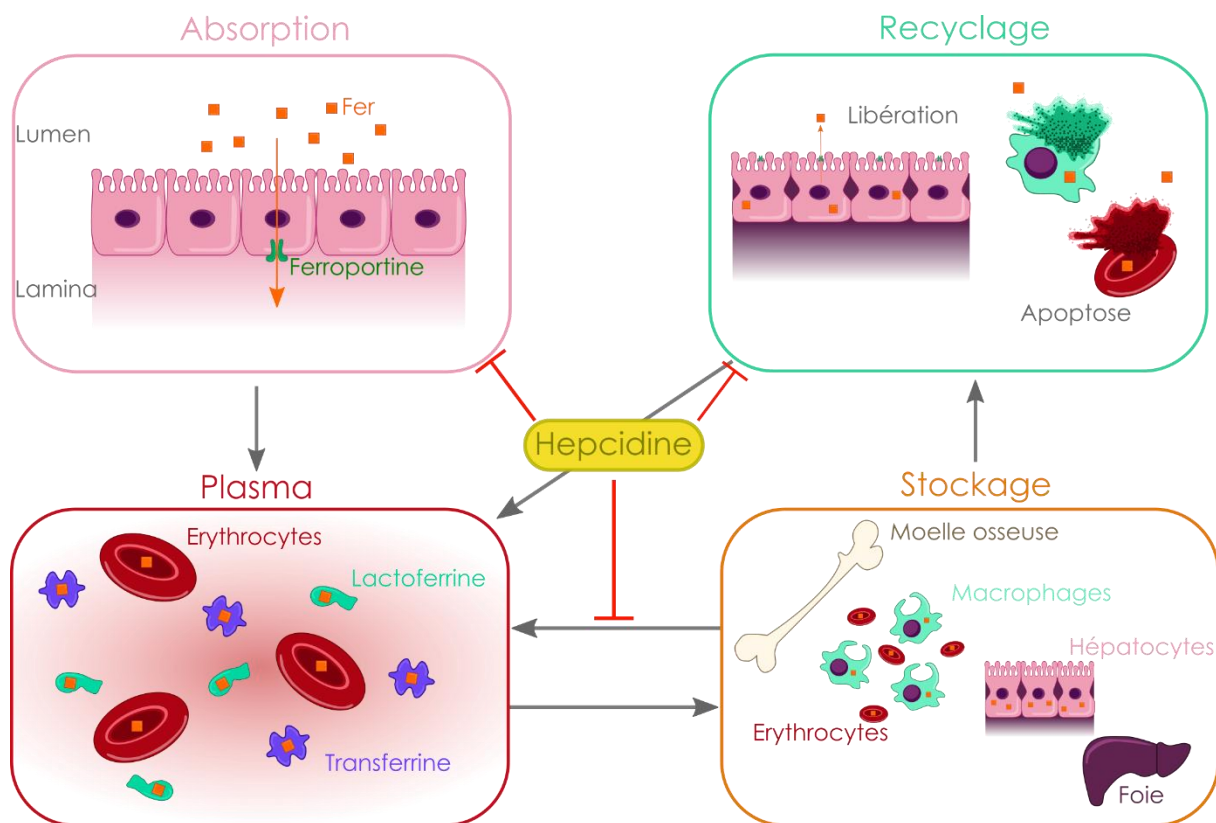


Figure 1 : Cycle simplifié de l'homéostasie du fer chez l'homme. Absorption : la source principale d'apport en fer est l'alimentation, le fer est absorbé *via* la paroi intestinale. Plasma : le fer se retrouve alors dans le sang, lié à des protéines. Stockage : le fer est ensuite stocké dans la moelle osseuse, le foie ou les macrophages et les érythrocytes. Recyclage : le fer stocké peut également être recyclé en fonction des besoins. Hepcidine : la quantité de fer en circulation dans l'organisme est gérée par l'hépcidine. Inspiré de (Ganz and Nemeth, 2015).

2.2. L'immunité nutritionnelle, la défense de l'hôte dans la bataille pour le fer

La présence de fer libre dans le corps humain est donc bien contrôlée et finement régulée de façon à éviter les effets néfastes dus à la présence de fer libre, mais également pour limiter l'accès au fer à de potentiels organismes pathogènes, mécanisme connu sous le nom d'immunité nutritionnelle, un concept mis en évidence par Weinberg en 1975 (Weinberg, 1975). L'hépcidine a été démontrée comme jouant un rôle important dans ce phénomène, cette dernière répondant non seulement à la concentration en fer mais également à la présence d'une inflammation, l'activation de son gène (*HAMP*) pouvant se faire par des cytokines (interleukine-6, activine B) ou des interférons de type I (Nemeth *et al.*, 2004; Besson-Fournier *et al.*, 2012; Ichiki *et al.*, 2014). La stimulation de l'hépcidine durant l'infection va alors entraîner une hyposidérémie caractéristique

du phénomène inflammatoire (Nicolas *et al.*, 2002). Durant l'infection la concentration en fer dans le plasma va alors diminuer de plus d'un facteur 10.

De plus, le fait que le fer restant ne soit pas libre mais lié à des protéines le rend d'autant plus inaccessible pour les pathogènes, surtout ceux ne possédant pas des systèmes d'import du fer très variés ou développés comme le genre *Vibrio* par exemple (Ganz and Nemeth, 2015). La transferrine et la lactoferrine sont importantes pour séquestrer le fer durant l'infection, la lactoferrine ayant l'avantage de rester liée au fer même à pH plus acide, ce qui est souvent le cas au cours de l'infection. Cette dernière a d'ailleurs été montrée comme étant surexprimée au cours de l'infection et ayant même des propriétés anti-microbiennes (Drago-Serrano *et al.*, 2017). La lipocaline-2 (ou NGAL pour *Neutrophil-Gelatinase Associated Lipocalin*), est également une protéine importante dans l'immunité nutritionnelle. En effet, cette protéine est capable de se lier aux complexes sidérophores-fer, les empêchant alors d'être récupérés par les microorganismes (Schmidt-Ott *et al.*, 2007). Cette protéine a une affinité particulière pour les sidérophores de types catéchols (comme l'entérobactine d'*Escherichia coli*). Elle est exprimée de façon constitutive mais peut être surexprimée suite à la présence de bactéries ainsi que par la voie des interférons (Flo *et al.*, 2004; Golonka *et al.*, 2019). Une autre lipocaline, la lipocaline-1, existe également dans les poumons. Elle a une affinité moindre mais peut se lier aux sidérophores de type hydroxamate (Fluckinger *et al.*, 2004).

3. Contre-attaque des bactéries, les systèmes bactériens d'import du fer

Le fer étant, de façon générale, peu biodisponible, mais ce d'autant plus en contexte infectieux, les microorganismes ont dû mettre au point des systèmes d'imports efficaces et ingénieux pour contrer ces défenses. Quatre grandes stratégies d'acquisitions sont retrouvées chez les bactéries : l'utilisation de l'hème et/ou des hémoprotéines, l'utilisation de la transferrine et de la lactoferrine, l'acquisition directe du fer(II) et la sécrétion de sidérophores. Toutes ces stratégies sont répandues parmi les bactéries pathogènes et sont également retrouvées chez les champignons pathogènes (Caza and Kronstad, 2013).

3.1. Utilisation de l'hème et des hémoprotéines

Pour accéder à l'hème (Figure 2) les bactéries pathogènes vont généralement sécréter des hémolysines, capables de lyser les érythrocytes voir même des protéases spécifiques de l'hémoglobine pour libérer le noyau d'hème ; ces systèmes sont retrouvés chez des bactéries Gram négatives telles que *E. coli* (Drago-Serrano *et al.*, 2006) ainsi que positives comme *Staphylococcus epidermidis* (Verdon *et al.*, 2009).

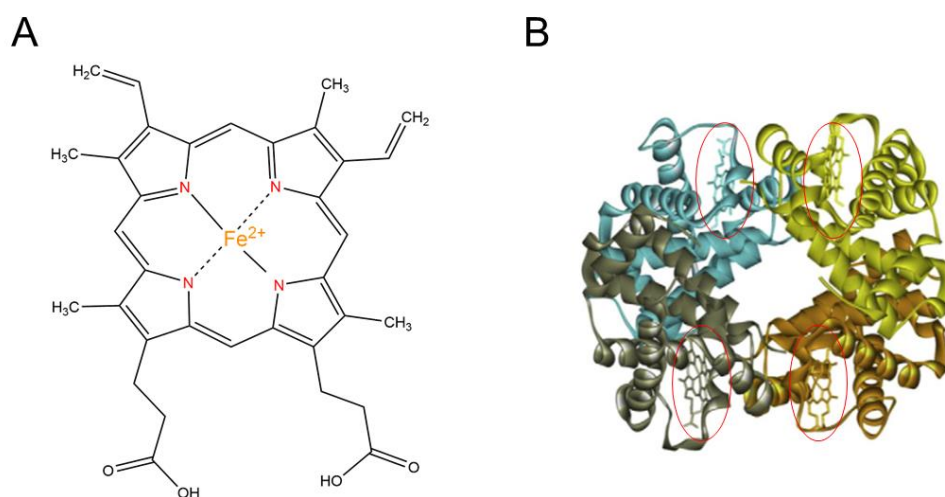


Figure 2 : La molécule d'hème et la protéine d'hémoglobine. A : formule chimique d'une molécule d'hème liée à un atome de fer(II) (en orange) par ses atomes d'azote (en rouge) ; B : Structure d'hémoglobine non oxygénée (tirée de (Safo *et al.*, 2011)) dont les 4 molécules d'hème sont entourées en rouge.

L'hème est ensuite utilisé directement libre ou encore au sein de protéines plus complexes. Chez les bactéries à Gram négatif l'acquisition du fer *via* l'import d'hème est un système comprenant un transporteur externe faisant partie de la famille des transporteurs TonB-dépendants (ou TBDT pour *TonB-Dependant Transporter*) (Figure 3). Ces transporteurs ont la particularité de pouvoir faire passer à travers la membrane externe des molécules de taille assez importante telles que l'hème justement, mais également les sidérophores ou de petits antibiotiques (ATB). Ils ont une structure générale assez conservée mais reconnaissent des ligands spécifiques et utilisent l'énergie du gradient de protons entre périplasma et cytoplasme *via* un complexe protéique conservé et composé des protéines TonB, ExbB et ExbD (Braun and Braun, 2002) (Figure 3). Une fois dans le périplasma, l'hème est conduit jusqu'à un transporteur de membrane interne de type ABC puis dégradé dans le cytoplasme pour libérer le fer (Anzaldi and Skaar, 2010). L'hémoglobine peut

également être utilisée directement en utilisant des TBDTs par certaines bactéries comme *Haemophilus influenzae* ou *Neisseria meningitidis* par exemple (Caza and Kronstad, 2013).

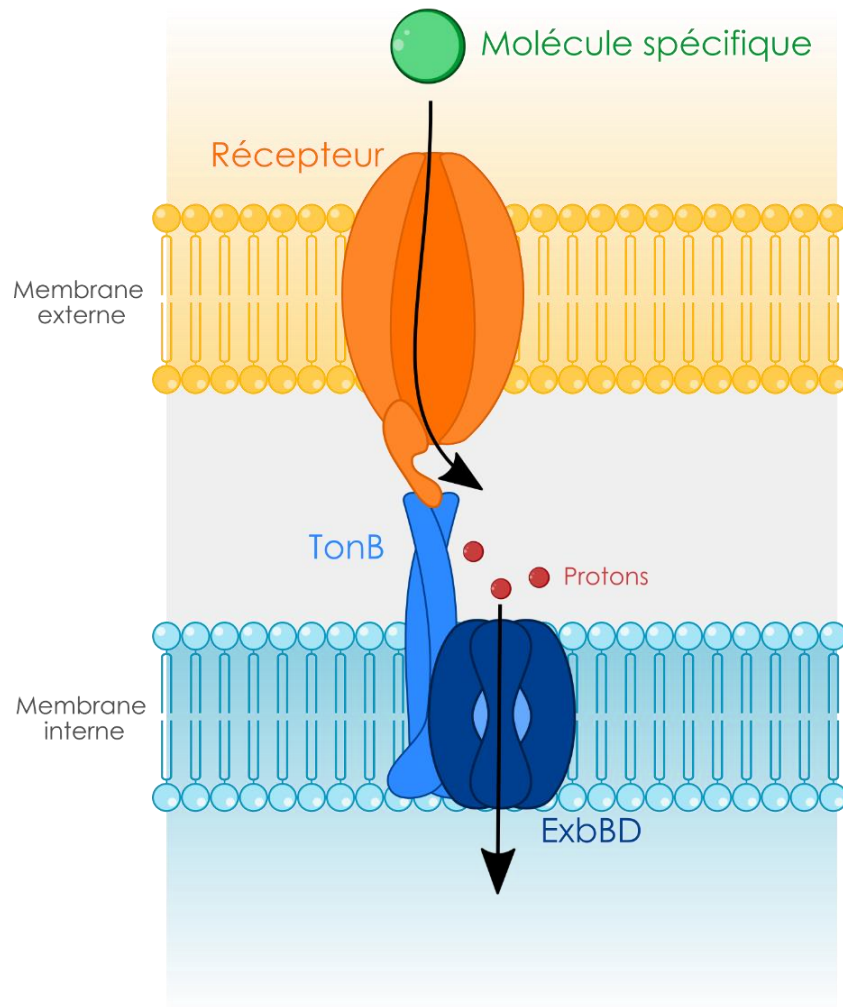


Figure 3 : Représentation schématique d'un TBDT. Un TBDT est un transporteur spécifique. La molécule est reconnue par le récepteur ancré dans la membrane externe. Leur liaison entraîne un changement de conformation permettant l'ouverture du récepteur. Le passage se fait de façon active grâce au complexe TonB-ExbBD qui utilise la force du gradient de proton.

Chez les bactéries Gram positives des systèmes similaires à ceux présents chez les bactéries Gram négatives sont retrouvés. Ils ne contiennent cependant pas de TBDT mais un récepteur de surface ainsi qu'une protéine chaperone facilitant l'internalisation de l'hème par le biais d'un transporteur ABC. Une fois internalisé l'hème est ensuite dégradé comme chez les bactéries Gram négatives (Caza and Kronstad, 2013).

Pour aller chercher l'hème certaines bactéries Gram négatives sont capables de sécréter des hémophores, protéines pouvant se lier à l'hème et ramenant ce dernier jusqu'à un transporteur spécifique. Cette famille de protéines particulièrement bien décrite chez *Serratia marcescens* est également présente chez *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Yersinia pestis*. Elles sont regroupées sous le nom de Has (pour *Heme Acquisition System*) et consistent en un système de sécrétion spécifique (appartenant aux systèmes de sécrétion de type I). L'hémophore qui va récupérer l'hème est un récepteur spécifique qui transporte le complexe dans le périplasme avec l'aide d'un système cousin du TonB. L'hème est ensuite libéré et transporté dans le cytoplasme comme décrit précédemment (Cescau *et al.*, 2007).

Un système similaire existe également chez les bactéries Gram positives, l'hémophore étant localisé à la surface des cellules. L'un des plus étudié est le système Isd (pour *Iron regulated Surface Determinant*) de *Staphylococcus aureus*. Il contient quatre protéines de surfaces, un transporteur et deux oxygénases cytoplasmiques (Mazmanian *et al.*, 2003). Ce système a également été retrouvé chez d'autres bactéries Gram positives telles que *Streptococcus pyogenes* ou *Bacillus anthracis* (Caza and Kronstad, 2013).

3.2. Utilisation de la transferrine et de la lactoferrine

Transferrine et lactoferrine sont une source non-négligeable de fer. Certaines bactéries ont donc développé des systèmes d'utilisation directe de ces protéines. *N. meningitidis* possède un système TbpAB (pour *Transferrin-Binding Proteins*) lui permettant de se lier à la transferrine et en dissocier le fer (Cornelissen *et al.*, 1992) et *Neisseria gonorrhoeae* un système LbpAB (pour *Lactoferrin-Binding Protein*) pour l'utilisation de la lactoferrine (Biswas and Sparling, 1995). Ces deux systèmes sont très similaires et comprennent un 'TBDT' ainsi qu'un co-récepteur nécessaire pour la dissociation protéine-fer.

Une autre manière détournée d'utiliser le fer de ces protéines par les bactéries se fait par le biais des hormones du stress (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine) qui sont des catécholamines et possèdent donc un groupement capable de chélater le fer. En condition d'infections ces dernières sont surexprimées et vont se lier à la transferrine et lactoferrine, ce qui va diminuer leur affinité pour le fer et le libérer dans l'environnement. Ce fer libre est alors disponible pour les bactéries (Caza and Kronstad, 2013). Des études tendent même à démontrer une utilisation des complexes catécholamines-fer directement par l'intermédiaire d'un système

d'import par TBDT. Cela a notamment été mis en évidence chez les bactéries à Gram négatives *Bordetella bronchiseptica* (Armstrong *et al.*, 2012) et tout récemment *P. aeruginosa* (Pa) (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020) mais également chez les bactéries à Gram positives *S. aureus* (Morrissey *et al.*, 2000) et *Bacillus subtilis* (Miethke and Skerra, 2010).

3.3. Utilisation du fer(II)

Le fer(II) libre dans le milieu, bien que peu présent est tout de même une source de fer facile d'accès et il serait donc étonnant que les bactéries n'aient pas développé de système d'acquisition pour ce type de fer. Il existe différents systèmes d'acquisition du fer(II) comme les systèmes MntH, FutABC, SitABCD ou EfeUOB par exemple, mais le plus étudié et le plus répandu chez les bactéries Gram négatives est le système FeoABC (Caza and Kronstad, 2013) (Figure 4). Dans ce système, découvert initialement chez *E. coli* K12 (Hantke, 1987), le fer(II) traverse la membrane externe de façon passive puis traverse la membrane interne *via* la protéine FeoB. Le rôle de la protéine FeoA, qui interagit avec FeoB n'est pour l'instant pas élucidé et la protéine FeoC semble quant à elle réguler l'expression du système (Lau *et al.*, 2016). Le rôle de ce système dans la virulence a également été mis en avant dans plusieurs études sur différentes bactéries pathogènes dont *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* ou encore *Y. pestis* (Lau *et al.*, 2016).

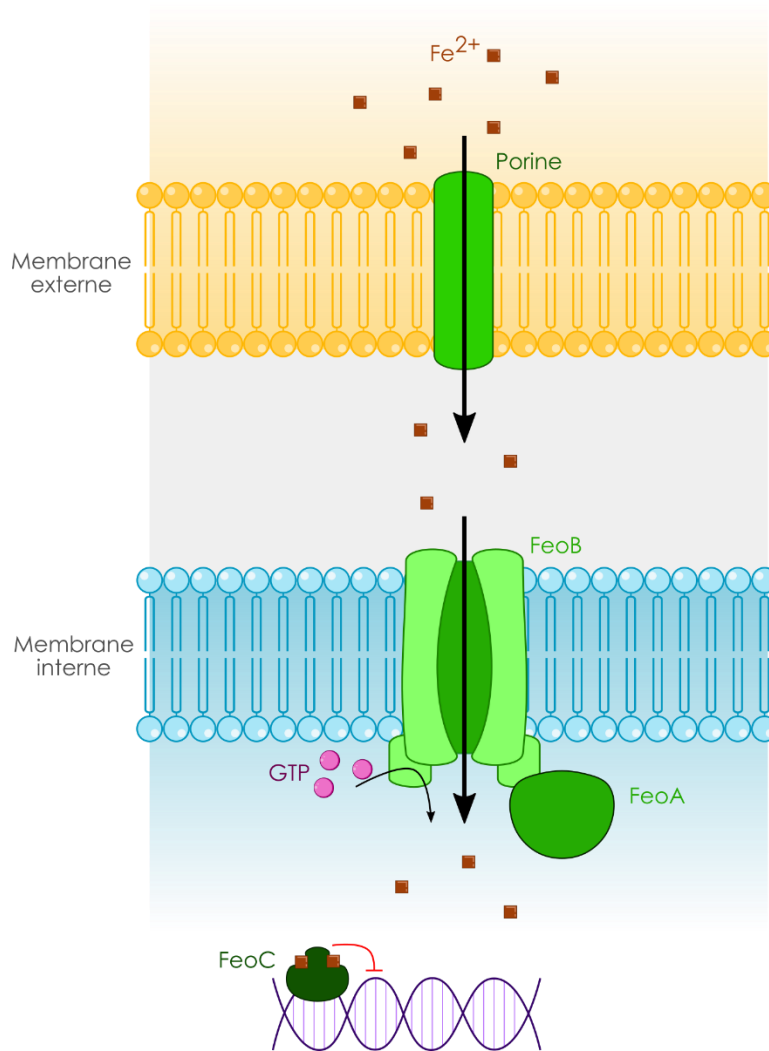


Figure 4 : Représentation schématique d'un système FeoABC type. Le fer(II) traverse la membrane externe par une porine puis la membrane interne grâce au transporteur ABC FeoB qui utilise le GTP comme source d'énergie. Le rôle de la protéine FeoA, qui interagit avec FeoB, n'est pas encore clairement défini. Le système est sous le contrôle de la protéine FeoC qui une fois complexée au fer(II) va inhiber la transcription de la voie Feo.

3.4. L'arme fatale pour l'acquisition du fer : les sidérophores

Les sidérophores sont de petites molécules organiques (entre 500 et 1500 Da) possédant une affinité très forte pour le fer(III). Ces molécules sont retrouvées chez les bactéries mais également chez les champignons et les plantes. Leur découverte remonte aux années 50 durant lesquelles plusieurs sidérophores que sont la mycobactine (sidérophore bactérien), le coprogène et le ferrichrome (sidérophores de champignons) furent identifiés (Francis and Madinaveitia, 1949;

Hesseltine *et al.*, 2002; Neilands, 2002). C'est ensuite un enchaînement de publications qui va mener à la caractérisation de ce qu'est réellement une molécule de sidérophore par Garibaldi et Neilands en 1956 (Garibaldi and Neilands, 1956). L'utilisation de sidérophores pour l'acquisition du fer est un mécanisme très répandu au sein du monde microbien et plus de 500 molécules de sidérophores ont été identifiées à ce jour (Hider and Kong, 2010).

Parmi cette grande collection de sidérophores il existe différents types de molécules, très variés, possédant des groupements chélateurs du fer différents. Cependant, tous possèdent une affinité très forte pour le fer(III) plutôt que pour le fer(II), et ce grâce à des groupements contenant des oxygènes chargés négativement. Les types de groupements chélateurs de fer les plus retrouvés dans les sidérophores sont les groupements catéchols (entérobactine d'*E. coli*) et hydroxamates (ferrichrome des genre *Aspergillus* et *Penicillium*) (Figure 5 A et B). Les autres sidérophores sont généralement rangés dans un troisième groupe nommé sidérophores mixtes (Hider and Kong, 2010) (Figure 5 C).

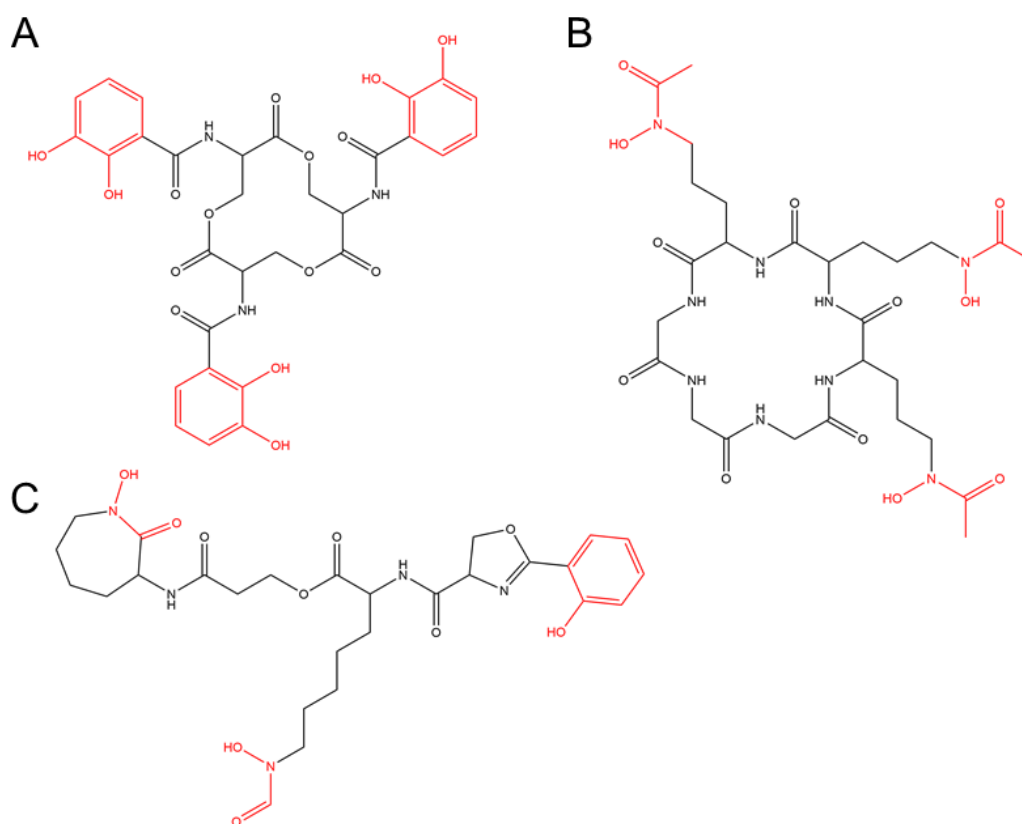


Figure 5 : Formule de différents sidérophores. Les groupements permettant la chélation du fer sont colorés en rouge. A : entérobactine d'*E. coli*, sidérophore de type catéchol ; B : ferrichrome du genre *Aspergillus spp.*, sidérophore de type hydroxamate ; C : mycobactine du genre *Mycobacterium spp.*, sidérophore mixte.

Les sidérophores sont des métabolites secondaires produits dans la cellule puis sécrétés dans le milieu extracellulaire où ils vont se chélater au fer(III) libre ou lié à des molécules de moindre affinité. Chez les bactéries Gram négatives les complexes ferri-sidérophores sont ensuite reconnus par un 'TBDT' spécifique. Si une bactérie est capable d'utiliser plusieurs sidérophores, chaque sidérophore sera lié à un 'TBDT' spécifique. Le complexe ferri-sidérophore peut ensuite passer la membrane interne *via* un transporteur ABC ou *via* une perméase (Figure 6 A et B). Le complexe est ensuite dissocié dans le cytoplasme (ou dans le périplasma selon la voie (Figure 6C)) avec libération du fer(III) par réduction en fer(II). Le sidérophore est quant à lui soit clivé et donc détruit, soit recyclé et à nouveau sécrété pour recommencer un nouveau cycle de chélation (Schalk *et al.*, 2011).

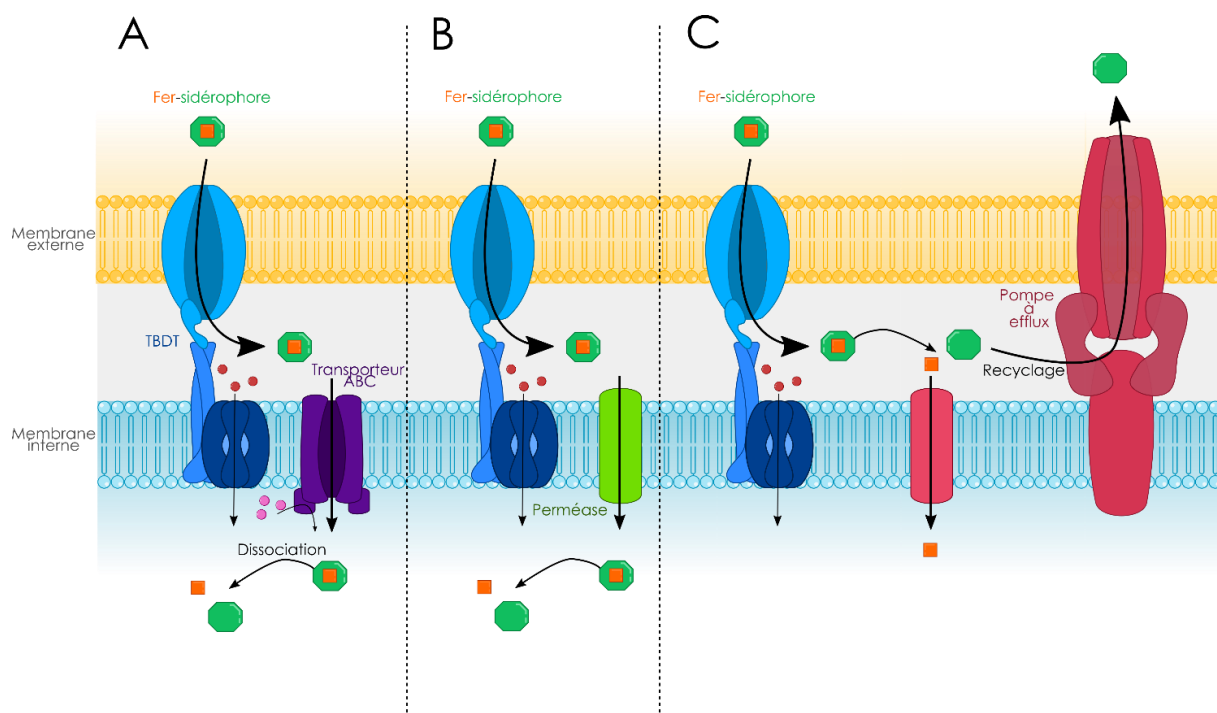


Figure 6 : Représentation schématique des différents types de voies d'acquisition des sidérophores, inspiré de (Schalk *et al.*, 2011). A : le complexe ferri-sidérophore est acheminé jusqu'au cytoplasme par un transporteur ABC pour le passage de la membrane interne où il est dissocié ; B : le complexe ferri-sidérophore est acheminé jusqu'au cytoplasme par une perméase pour le passage de la membrane interne où il est dissocié ; C : Le complexe ferri-sidérophore est dissocié dans le périplasma, le fer internalisé et le sidérophore dégradé ou potentiellement recyclé.

Chez les bactéries Gram positives les sidérophores sont un mécanisme d'acquisition du fer bien moins représenté. Seules quelques bactéries Gram positives sont connues pour en produire

comme *S. aureus* et le genre *Bacillus* (Hider and Kong, 2010). Ne possédant pas de membrane externe, le complexe ferri-sidérophore n'est pas reconnu par un 'TBDT', cependant il passe la membrane de la même façon que la membrane interne des bactéries Gram négatives, c'est-à-dire par le biais d'un transporteur ABC, couplé à un récepteur spécifique.

Les sidérophores sont une voie d'acquisition du fer particulièrement efficace puisque les molécules de sidérophores peuvent aller plus loin que l'environnement immédiat de la cellule pour récupérer le fer, libre, ou lié à des protéines comme la transferrine et la lactoferrine, comme c'est le cas de la pyoverdine chez *Pa* par exemple. Les sidérophores jouent un rôle particulièrement important dans l'homéostasie du fer chez les bactéries Gram négatives et leur rôle dans l'infection a été largement démontré. Ce rôle de facteur de virulence sera plus particulièrement développé pour les sidérophores de *Pa*, plus loin dans cette synthèse.

Les bactéries adaptent également la production de leurs sidérophores en réponse aux mécanismes développés par l'hôte pour lutter contre l'infection à travers le fer, établissant un 'ping-pong' réactionnel pour piéger le fer (Golonka *et al.* 2019) (Figure 7). Comme cité plus haut, l'hôte est capable de contrer l'effet des sidérophores en produisant de la lipocaline, molécule chélatrice de sidérophores, essentiellement de type catéchols (Schmidt-Ott *et al.*, 2007). Mais les bactéries sont capables à leur tour de contrer cette défense. Pour cela plusieurs tactiques sont employées (Figure 7). Certaines bactéries vont produire des sidérophores de type hydroxamate ou mixte, très peu reconnus par la lipocaline. C'est par exemple le cas des pyoverdine et pyochéline de *Pa*, de la yersiniabactine de *Y. pestis* ou encore de l'aérobactine d'*E. coli*. D'autres vont modifier leur sidérophores pour qu'ils ne soient plus complexés à la lipocaline comme *Salmonella spp.* et *Klebsiella spp.* qui modifient leur entérobactine en salmochéline par ajout de résidus glycosylés (Golonka *et al.*, 2019). Une autre stratégie de contre observée chez *K. pneumoniae* est de sous exprimer la synthèse d'entérobactine et de relarguer plus de produits de dégradation de cette dernière, des molécules de 2,3-DiHydroxyBenzoylSerine (DHBS) qui vont tout de même chélater le fer, sans pouvoir être captées par la lipocaline (Golonka *et al.*, 2019).

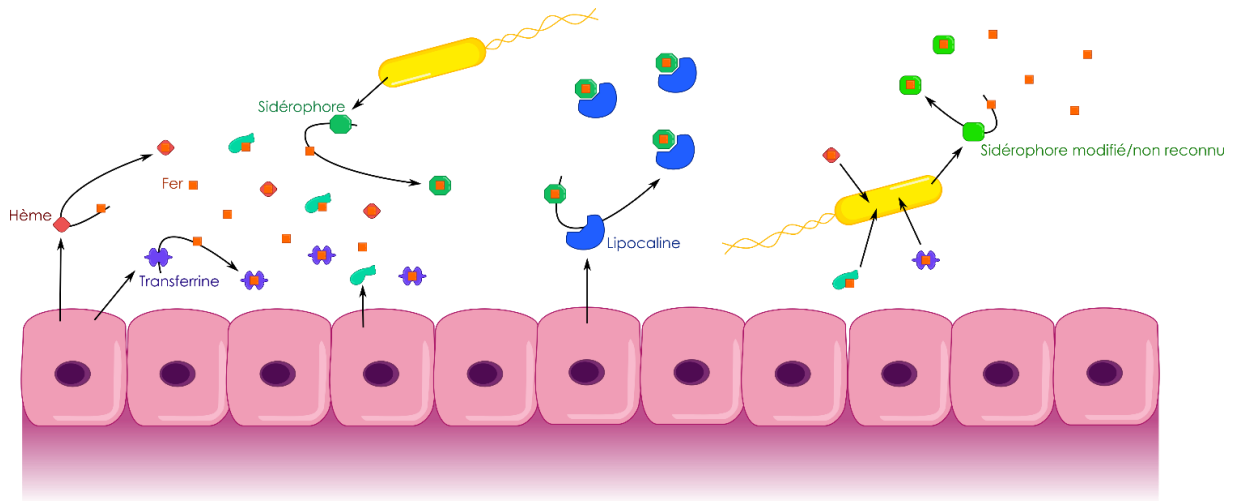


Figure 7 : Représentation schématique des interactions hôte-pathogènes 'ping-pong' pour l'acquisition du fer. L'hôte produit des protéines chélatrices du fer pour éviter sa circulation libre. Le pathogène produit des sidérophores pour récupérer le fer (par exemple l'entérobactine). L'hôte sécrète de la lipocaline pour intercepter l'action des sidérophores (l'entérobactine est reconnue par la lipocaline). Le pathogène produit des sidérophores modifiés ou non reconnus par la lipocaline pour contourner les défenses et peut utiliser les protéines chélatrices de l'hôte (comme par exemple la salmochéline ou le DHBS, qui remplacent l'entérobactine).

Chapitre II

Les infections bactériennes pulmonaires dans le cas de la mucoviscidose

1. La mucoviscidose

1.1. Une maladie génétique aux nombreuses conséquences

La mucoviscidose (CF pour *Cystic Fibrosis*) est une maladie génétique autosomale récessive due à la mutation du gène *cftr* (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Bien que la maladie soit due à la mutation de ce seul gène, les symptômes observés chez les malades peuvent être très lourds et varier en fonction de la mutation observée. Plus de 2000 mutations ont été caractérisées et environ 150 sont connues pour déclencher la maladie (Ratjen *et al.*, 2015a). Il s'agit de la maladie génétique encore mortelle la plus répandue dans la population de type caucasienne. Le nombre de personnes atteintes de CF dans le monde est estimé à 70 000, avec une prévalence très variable en fonction des régions du globe. En France, la prévalence est estimée à 1 pour 2500 (Registre français de la mucoviscidose, 2019).

Le gène *cftr* code pour un transporteur actif d'ions chlorures et bicarbonates présents dans la membrane des cellules épithéliales. Il permet le passage de ces anions du milieu intra vers extracellulaire, et inversement, grâce à l'utilisation d'ATP (Figure 8). L'apparition de mutations dans ce gène va entraîner une diminution du nombre de transporteurs dans les membranes, une baisse d'efficacité ou encore les deux phénomènes à la fois (Figure 8). Chaque type de mutation conduit à des symptômes très différents et de gravité variable (Figure 8). La caractérisation de la mutation est donc importante car toutes n'entraînent pas les mêmes réponses aux traitements. En plus de la mutation en elle-même, des modifications dans les gènes adjacents ou des facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'apparition et l'exacerbation des symptômes (Goss *et al.*, 2004; Drumm *et al.*, 2005; Collaco *et al.*, 2008; Blackman *et al.*, 2013).

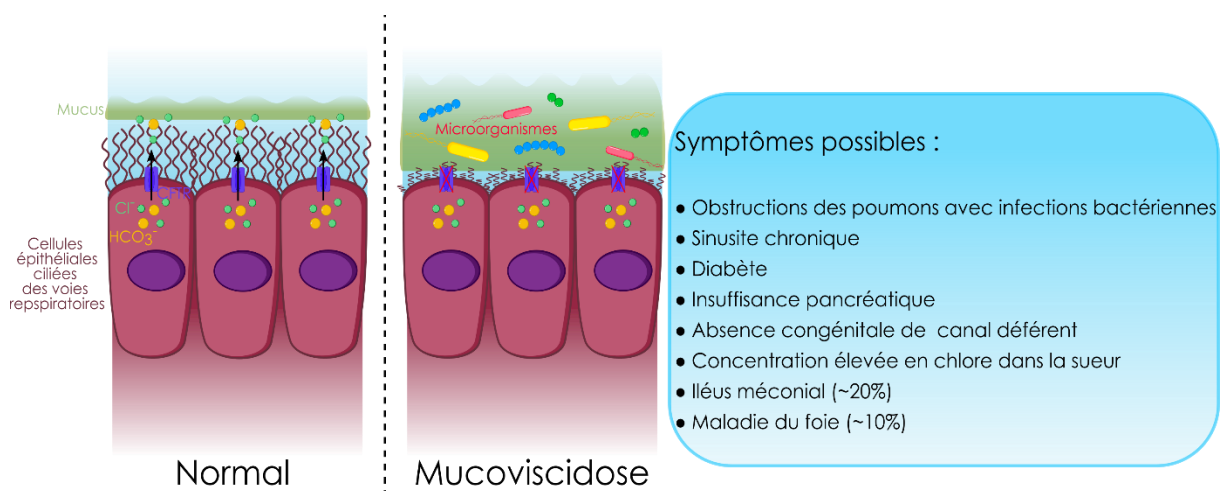


Figure 8 : Représentation schématique de la condition normal dans les tissus pulmonaires (gauche) et atteints de CF (droite) ainsi que liste des symptômes les plus souvent associés à la CF (inspiré de (Ratjen *et al.*, 2015b)). Dans un tissu pulmonaire normal les cellules ciliées possèdent des cils fonctionnels évacuant le mucus. Dans le cas de la CF les cellules possèdent des cils non fonctionnels et le mucus à des propriétés physico-chimiques altérées, ce qui empêche sa bonne évacuation, favorisant le développement de microorganismes.

La CF affecte les fonctions des tissus épithéliaux dans lesquels le transporteur CFTR est particulièrement exprimé, en particulier les épithéliums glandulaires. Ces types de tissus se retrouvent principalement dans les poumons, le pancréas, le tractus intestinal, le canal déférent ou encore les glandes sudoripares. Tous ces organes peuvent alors devenir anormalement fonctionnels en raison de problèmes au niveau des sécrétions conduisant le plus souvent à des troubles d'ordre pulmonaires, digestifs, de fertilité ou encore du diabète. De façon indirecte, les personnes atteintes de mucoviscidose sont également immunodéprimées, ce qui les rend particulièrement fragiles.

L'impact de la CF sur les poumons est celui entraînant le plus fort taux de mortalité. En effet, dans les poumons, un transporteur CFTR muté va entraîner une modification de la sécrétion et des caractéristiques physico-chimiques du mucus pulmonaire. Ce dernier va alors être plus difficilement évacué des voies respiratoires et entraîner des obstructions favorisant une inflammation constante entraînant des dommages tissulaires ainsi que le développement d'infections, le tout conduisant à une forte diminution des capacités respiratoires.

Il n'existe actuellement aucun remède pour soigner la CF. Des pistes sont suivies en thérapie génique mais un gros travail est encore à faire, bien qu'encourageant (Maule *et al.*, 2020). Il existe cependant des thérapies permettant de soulager les malades notamment la pratique

d'exercices de kinésithérapie pour favoriser le dégagement du mucus, l'inhalation d'hydratants pour les voies respiratoires ou encore la prise d'ATB pour le traitement des infections. Lorsque les cas deviennent particulièrement graves, il peut même être envisagé une transplantation des poumons, cependant cela rend les malades encore plus vulnérables dû à la prise d'immunosuppresseurs.

1.2. Etat du fer dans la mucoviscidose

Il a été démontré que le fer est présent en plus forte concentration dans le mucus des patients CF que dans celui des personnes saines (Stites *et al.*, 1998). En temps normal, du fait de l'immunité nutritionnelle entre autres, les concentrations en fer dans le mucus sont les plus basses possibles. L'augmentation de la concentration en fer dans le cas de la CF pourrait être due à l'inflammation importante des tissus pulmonaires et c'est notamment la ferritine qui est présente en concentrations plus importantes (Stites *et al.*, 1998) mais la concentration en fer libre est elle aussi augmentée (Reid *et al.*, 2007). Le fait que le fer soit plus fortement présent dans le mucus des patients CF pourrait alors être un des facteurs favorisant la colonisation par les pathogènes mais également favorisant leur persistance et évolution.

2. Les infections pulmonaires dans le cas de la mucoviscidose

Il est maintenant admis qu'au-delà des voies respiratoires hautes, colonisées par une flore normale pouvant être composée des genre *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ou *Neisseria* (Charlson *et al.*, 2011), une flore commensale est également présente dans les poumons, comprenant de nombreux genres tels que *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* ou encore *Pseudomonas* (Zakharkina *et al.*, 2013). Cependant, chez les personnes CF, l'environnement pulmonaire est totalement déséquilibré et différent. En temps normal, les cellules épithéliales ciliées sont chargées de nettoyer les poumons de tous les pathogènes et impuretés n'ayant pas leur place. Mais chez les personnes CF, ces cellules sont dysfonctionnelles ; elles sont moins efficaces et le mucus qu'elles sécrètent est physico-chimiquement altéré. De plus, la réponse immunitaire est diminuée. Le mucus a alors tendance à stagner dans les poumons, entraînant un déséquilibre, une diminution de la flore commensale et une inflammation constante des tissus (Cullen and McClean, 2015). Ces conditions vont favoriser les infections, auxquelles les personnes CF sont très sensibles.

Dès leur plus jeune âge les patients CF sont très surveillés. Ils sont soumis à des prélèvements réguliers afin de contrôler la présence de pathogènes dans leurs expectorations. Les pathogènes les plus souvent détectés sont *S. aureus*, Pa et *Aspergillus spp.* (Registre français de la mucoviscidose, 2019). Des études ont montré qu'à l'âge de 20 ans, les poumons de 60 à 70 % des patients sont colonisés par des bactéries pathogènes (Cystic Fibrosis Foundation, 2019). L'âge est un facteur important dans le type de pathogène présent et la colonisation des poumons par différents pathogènes va évoluer au cours du temps (Figure 9). Généralement les premières infections commencent dès la petite enfance, en grande majorité par la présence de *S. aureus*. L'apparition de Pa arrive généralement plus tardivement durant l'enfance, voir l'adolescence, mais cela dépend beaucoup de l'environnement du patient. Et ce n'est que plus tard que d'autres pathogènes sont retrouvés (Folkesson *et al.*, 2012).

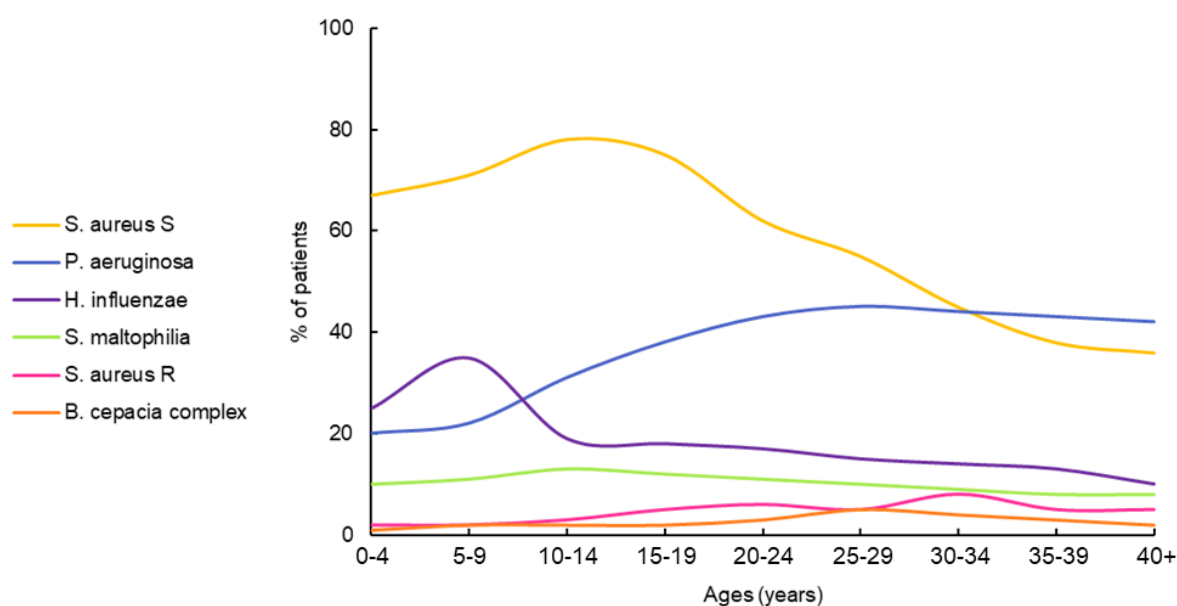


Figure 9 : Evolution des pathogènes bactériens retrouvés dans les poumons des patients CF en fonction de l'âge, tiré de (Registre français de la mucoviscidose, 2019).

Une fois dans les poumons, les bactéries pathogènes vont le plus souvent finir par s'adapter de façon de persister dans les poumons sur le long terme, développant alors une infection chronique. En effet, les pathogènes vont être soumis à différents stress auxquels ils vont devoir faire face. Tout d'abord l'apport en nutriments est très limité dans les poumons, les bactéries vont donc devoir adapter leur physiologie en fonction des nutriments, globalement peu disponibles. La constante inflammation des tissus pulmonaires va également servir de pression sur l'évolution des bactéries. Ces dernières vont devoir diminuer leur virulence pour échapper plus facilement au

système immunitaire, mis en exergue par l'inflammation constante. La présence d'autres microorganismes va également être un point de pression sur l'évolution, la compétition pour les nutriments se faisant alors d'autant plus forte. Enfin, les patients infectés vont recevoir des traitements ATB et ces derniers vont également appliquer une pression de sélection au sein des poumons (Cullen and McClean, 2015).

Pour s'adapter et finir par coloniser chroniquement les poumons, les pathogènes vont donc évoluer. Parmi les différents aspects de leur physiologie qui vont changer, la diminution de l'expression de facteurs de virulence est un aspect particulièrement important. En effet, ces derniers entraînent une interaction directe avec l'hôte et sont généralement fortement immunogènes (Wu *et al.*, 2008). Une diminution de l'expression des facteurs de virulence va alors permettre aux pathogènes de passer plus inaperçus aux yeux du système immunitaire. Mais les pathogènes vont également évoluer de façon plus globale pour adapter leur physiologie à l'environnement pulmonaire.

L'évolution se fait par une modification directe du génome par des mutations qui peuvent être de différents types : mutations ponctuelles, réarrangements génomiques ou encore conversion génique. L'évolution est très différente en fonction de l'espèce bactérienne, mais de grandes tendances se retrouvent lors des infections chroniques chez les patients CF. Tout d'abord, même si le patient est colonisé par une souche de départ, l'évolution ne va pas suivre le même schéma pour tous les clones découlant de cette souche. La sous-population de ce pathogène va alors prendre différentes directions d'évolution et une population hétérogène sera alors retrouvée dans le poumons, avec différents clones présents en différentes proportions en fonction des conditions, ce qui est particulièrement le cas lors des infections chroniques à Pa (Fothergill *et al.*, 2010) mais a également été observé pour d'autres bactéries comme *Burkholderia multivorans* par exemple (Silva *et al.*, 2011). Une caractéristique souvent observée dans ces populations est l'hypermutableté. Il s'agit d'une caractéristique augmentant fortement le taux de mutations, suite généralement à une mutation dans un gène impliqué dans la réparation de l'ADN. Ce genre de souche est fréquemment retrouvé chez *H. influenzae* ou Pa, chez qui elles sont plus souvent isolées dans le cas d'infections chroniques qu'aiguës (Oliver, 2010).

Suite à ces évolutions, quelques phénotypes sont souvent retrouvés lors des infections chroniques. Le phénotype mucoïde est l'un d'eux. Il s'agit d'un phénotype pour lequel des exopolysaccharides (EPS) sont sursécrétés, donnant un aspect très gluant aux colonies. Chez Pa, ce type de colonies est généralement dû à des modifications dans des gènes impliqués dans la synthèse du biofilm comme *mucA*, un facteur anti-sigma qui inhibe l'expression de l'opéron *algD*

impliqué dans la production de biofilm de type alginate et souvent corrélé avec une diminution de la virulence. Ce phénotype est également retrouvé chez les membres du *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) comme *B. multivorans* et *B. cenocepacia*, chez qui l'apparition de ce type de colonies est dû à des mutations dans le gène *manC*, impliqué dans la sécrétion d'EPS et la synthèse de l'antigène O et souvent associé avec une diminution du déclin de la fonction pulmonaire observé en règle générale lors d'une infection par un membre du Bcc. Chez la bactérie Gram positive *S. aureus* un phénotype semblable peut être retrouvé avec une diminution de l'expression des EPS de capsules, entraînant une meilleure persistance dans les poumons ainsi qu'une réduction de la virulence (Cullen and McClean, 2015).

Un autre phénotype régulièrement retrouvé lors des infections chronique est le phénotype de *Small Colony Variant* (SCV), identifié chez *S. aureus*, Pa, ou encore les membres du Bcc. Ce phénotype entraîne l'apparition de colonies très petites et les cellules ont une croissance particulièrement lente. L'apparition de ce phénotype serait majoritairement dû à l'utilisation de traitements ATB répétés et est capable de réverter assez facilement (Cullen and McClean, 2015).

Les poumons des patients CF finissent donc fréquemment par être colonisés de façon chronique par Pa une fois adultes, cette dernière prenant progressivement la place de *S. aureus* dans les poumons grâce à la sécrétion de nombreux facteurs anti-staphylococciques. Il n'est pas rare de voir apparaître chez les personnes infectées chroniquement des sur-infections à d'autres pathogènes ou des co-infections entre Pa et *S. aureus*. Ces autres pathogènes capables de co-coloniser les poumons sont appelés des pathogènes émergents. Ils sont dits 'émergents' car leur identification est assez récente, par rapport aux pathogènes des patients CF bien connus tels que *S. aureus* ou Pa. Leur apparition et identification peut être expliquée par les nouvelles méthodes d'identification se basant sur des informations génomiques, certains d'entre eux étant avant identifiés à tort comme étant des Pa ou faisant partie du Bcc. L'augmentation de l'espérance de vie des patients CF ainsi que la pression ATB forte peuvent également expliquer leur apparition (Parkins and Floto, 2015). Parmi ces pathogènes émergents sont de plus en plus souvent identifiés *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, les mycobactéries non-tuberculeuses (NTM pour *NonTuberculous Mycobacteria* ; les autres espèces de mycobactéries en dehors de *M. tuberculosis* ou *M. leprae*), ou encore des bactéries des genres *Cupriavidus*, *Inquilinus* ou *Pandorea*. Toutes ces bactéries sont généralement caractérisées par une virulence plus faible que Pa ou les membres du Bcc mais par une très forte persistance dans les poumons.

L'apparition de ces pathogènes assez tardivement dans la vie du patient peut s'expliquer par la dégradation de son état de santé, mais également par l'évolution des pathogènes déjà présents,

bien souvent *Pa* reste malgré tout, le pathogène bactérien le plus problématique chez les personnes atteintes de CF une fois l'enfance passée.

3. Traitements antibiotiques administrés dans le cadre de la mucoviscidose

Pour traiter les infections bactériennes, les patients sont soumis à des traitements ATB, pour certains germes comme *Pa* dès leur détection dans les poumons. Les antibiothérapies peuvent être administrées par trois voies : orale, intraveineuse ou inhalée. L'avantage de l'inhalation est que les ATB sont directement diffusés dans les poumons en concentration importante et cela permet également de faire le traitement de façon plus local et donc de diminuer les effets secondaires sur les autres flores du corps.

Les ATB utilisés varient en fonction du germe présent mais aussi du type d'infection (primo-infection ou infection chronique). Pour *Pa* par exemple, en cas de primo-infection sont préconisés des combinaisons de deux ATB (lactamine + aminoside) par inhalation, la tobramycine étant l'ATB de premier choix (Haute Autorité de Santé, 2017). Dans le cas d'une infection chronique, le choix des ATB dépendra de l'historique de traitements du patient, s'il s'agit d'une phase d'exacerbation des symptômes ou non. Dans le cas des traitements prolongés pour contenir l'infection chronique les ATB préconisés sont généralement la tobramycine, la colistine ou l'aztréonam. Pour *S. aureus* le protocole est différent, les principales molécules utilisées étant l'amoxicilline – acide clavulanique, le triméthoprim-sulfaméthoxazole ou encore la ciprofloxacine ou le linézolide (Haute Autorité de Santé, 2017). S'il s'agit de souche de type *S. aureus* Résistant à la Mécilline (SARM) le protocole de traitement sera différent. Pour d'autres encore tels que *B. cepacia* ou *A. xylosoxidans* les traitements sont plus délicats et difficiles car ces bactéries sont plus facilement multi-résistantes.

Chapitre III

Pseudomonas aeruginosa

1. Généralités sur *P. aeruginosa*

Pa est une bactérie à Gram négatif faisant partie de la classe des *Gammaproteobacteria*. Ubiquitaire, elle se retrouve dans tous types d'environnements, mais plus particulièrement dans les milieux hydriques.

Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1882 dans l'article « Sur les colorations bleue et verte des linges à pansements » par Carle Gessard, pharmacien militaire devenu bactériologiste et ayant dédié sa carrière scientifique à l'étude de la pyocyanine et de son bacille. Souvent appelée 'bacille pyocyanique' en raison de la couleur caractéristique bleue des infections qu'elle entraîne, *Pa* est un pathogène dit 'opportuniste', peu ou non virulent chez les personnes saines mais pouvant être fatal pour les personnes immunodéprimées. Elle pose une réelle problématique à l'hôpital, source d'infection majoritaire à cette bactérie, puisqu'on la retrouve en quatrième position des bactéries les plus souvent isolées lors d'infections nosocomiales après *E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis* avec 6.28% des infections dont le pathogène est identifié (Santé Publique France, 2018). De plus, une fois une infection à *Pa* installée, il est difficile de la traiter car elle est naturellement résistante à plusieurs ATB (chloramphénicol, kanamycine et triméthoprim-sulfaméthoxazole, céfotaxime) et surtout développe rapidement des résistances à de nombreuses familles d'ATB telles que les carbapénèmes, les aminoglycosides ou encore les fluoroquinolones (El Zowalaty *et al.*, 2015). Sa résistance aux ATB est tellement problématique qu'elle a été classée comme de priorité critique pour la recherche et le développement de nouveaux ATB par l'Organisation Mondiale de la Santé (Organisation Mondiale de la Santé, 2017).

Pa est un bacille mesurant entre 1 et 5 μm à flagelle polaire. Il s'agit d'une bactérie aérobie, capable d'anaérobiose dans des conditions très particulières uniquement et ayant la particularité de pouvoir se développer jusqu'à 42°C, ce qui n'est pas le cas des autres membres du genre *Pseudomonas*. Bien qu'elle ne possède qu'un seul chromosome, la taille de son génome est particulièrement imposante avec un peu plus de 6.2 Mbp. Ce dernier contient 5 570 cadres de lectures identifiés chez *Pa* PAO1 dont un nombre important de gènes impliqués dans la régulation, la virulence et la résistance aux ATB (Stover *et al.*, 2000).

2. Les sidérophores de *P. aeruginosa*

Comme décrit précédemment, le fer est essentiel au développement des organismes et les bactéries ont développé de nombreuses stratégies d'acquisition du fer, dont les sidérophores. *Pa* possède deux sidérophores endogènes : la pyoverdine (PVD) et la pyochéline (PCH).

2.1. La pyoverdine

La PVD est un sidérophore caractéristique du genre *Pseudomonas*. Bien que décrite dès la fin du XIX^{ème} siècle, elle n'a été réellement caractérisée qu'en 1978 (Meyer and Abdallah, 1978; Meyer and Hornsperger, 1978). Il existe plus de 60 PVD différentes en fonction des espèces de *Pseudomonas* (Demange *et al.*, 1990; Budzikiewicz, 1997) mais elles sont toutes composées de trois parties : un chromophore (dihydroquinoline) qui donne ses caractéristiques fluorescentes et sa couleur verte à la molécule et qui ne varie pas d'une espèce à l'autre, une chaîne peptidique qui varie en fonction de la souche bactérienne et est responsable de la sélectivité des PVD et un groupement acyl lui aussi variable. La PVD est un sidérophore dit 'mixte' comprenant à la fois une fonction catéchol et deux fonctions hydroxyles (Figure 10). La PVD se lie au fer(III) avec une stœchiométrie de 1 et a pour le fer un pFe de 27 (Albrecht-Gary *et al.*, 1994) ce qui en fait un chélateur fort du fer (le pFe étant l'affinité pour le fer définie de façon analogue au pH ; $-\log[\text{Fe(III)}]$ à un pH de 7,4 (Hider and Kong, 2010)). La PVD a également été démontrée comme pouvant chélater d'autres métaux comme le cobalt, le cuivre, le manganèse, le nickel ou encore le zinc mais avec une affinité beaucoup plus réduite (Braud *et al.*, 2009). Dans ces cas, la PVD peut avoir un rôle de protection contre ces métaux, car ces complexes PVD-métal ne pénètrent pas dans la cellule (Schalk *et al.*, 2011). Chez *Pa* 4 types de PVD ont été décrits allant de la PVD I à IV en fonction de la composition de leur chaîne peptidique (Meyer *et al.*, 1997).

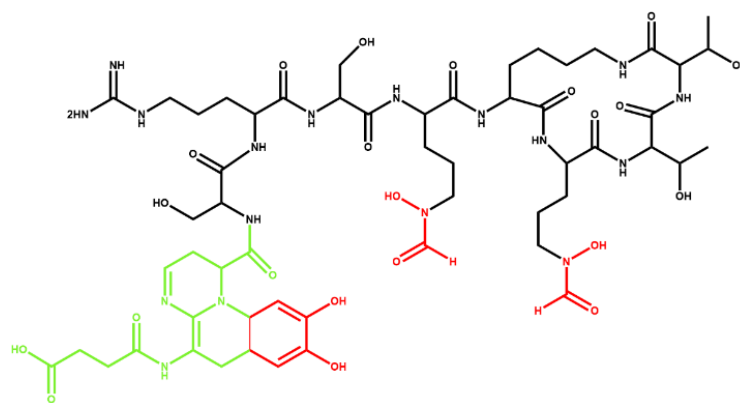


Figure 10 : Formule chimique de la PVD de type I de Pa PAO1. Les parties chélatrices de fer sont indiquées en rouge et le groupement chromophore en vert.

La synthèse de la PVD est un processus complexe, commençant dans le cytoplasme, à l'intérieur du sidérosome, où 3 enzymes sont chargées de la synthèse des précurseurs de la PVD (PvdAF pour le formylhydroxiornithine et PvdH pour le 2,4-diaminobutarate (Schalk *et al.*, 2020)) puis où 4 synthétases à peptides non-ribosomiques (NRPS pour *NonRibosomal Peptide Synthetase*) vont assembler la chaîne peptidique (Gasser *et al.*, 2015). PvdL synthétise la chaîne grasse permettant l'ancrage du précurseur dans la membrane cytoplasmique et l'ajout des premiers acides aminés de la chaîne peptidique, PvdDIJ additionnant la suite des acides aminés de la chaîne peptidique (Figure 11). Ce précurseur de la PVD est ensuite transporté dans le périplasme *via* un transporteur ABC (PvdE) où il va être maturé par 5 enzymes (Lamont and Martin, 2003). PvdQ qui clive la chaîne grasse, PvdP qui cyclise le chromophore, PvdN qui modifie la chaîne variable et PvdMO dont les rôles ne sont pas encore définis (Figure 11).

Une fois synthétisée, la PVD est sécrétée dans le milieu extérieur par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Hannauer *et al.*, 2010) (Figure 11). Dans le milieu extracellulaire, la PVD va ensuite se lier au fer(III) et former un complexe ferri-PVD. Ce complexe peut-être reconnu par 2 TBDT FpvAB (Poole *et al.*, 1993; Ghysels *et al.*, 2004) et est ensuite transporté dans le périplasme où il est pris en charge par les protéines FpvCF qui vont apporter la ferri-PVD à un complexe multiprotéique FpvGHJFC où il sera réduit grâce à la réductase FpvG (Bonneau *et al.*, 2020). FpvC se charge ensuite d'apporter le fer(II) au transporteur ABC FpvDE qui permettra le passage de la membrane interne (Brillet *et al.*, 2012) (Figure 11). L'apo-PVD est quant à elle prise en charge par FpvF qui l'apporte jusqu'à la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Bonneau *et al.*, 2020) qui permettra son recyclage et le début d'un nouveau cycle de chélation puisque la dissociation du complexe ferri-PVD n'implique qu'une réduction et aucune modification rendant l'apo-PVD non fonctionnelle (Figure 11).

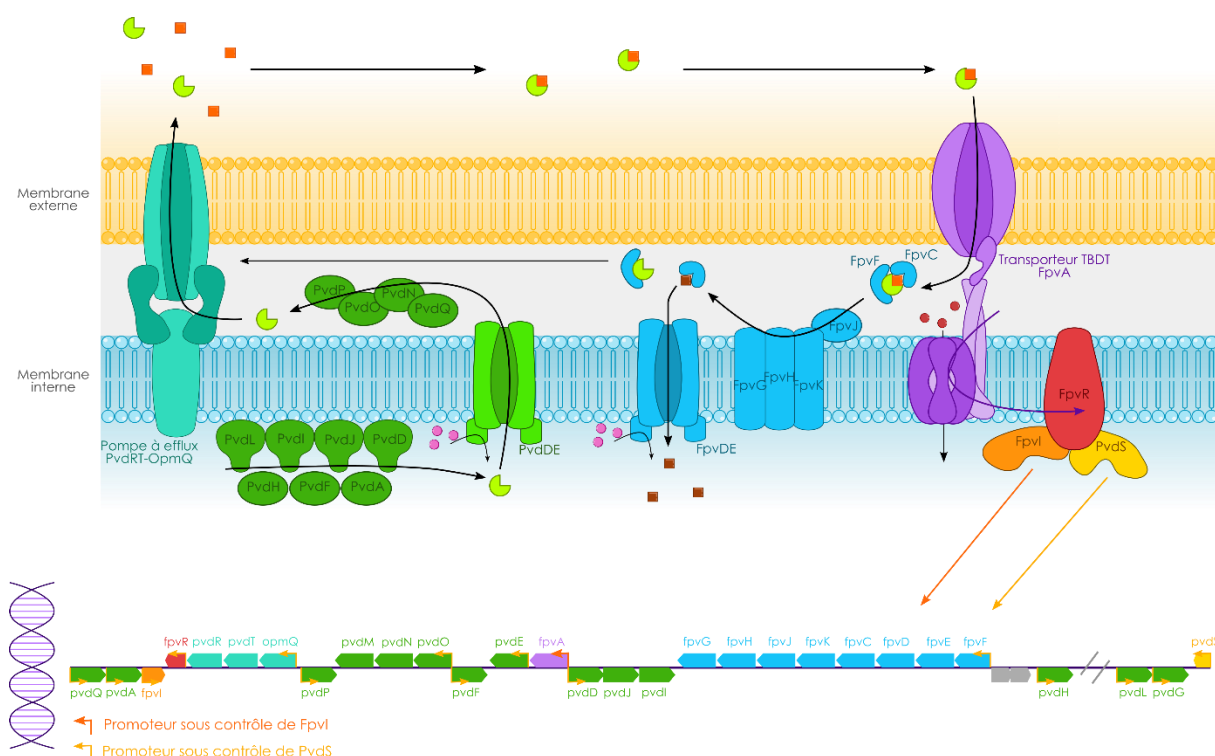


Figure 11 : Représentation schématique de la voie PVD. A gauche en vert, la biosynthèse de la PVD et son sécrétion, à droite en violet son passage de la membrane externe et en bleu le processus de dissociation-internalisation du fer et recyclage de la PVD. Tout à droite sont représentés les régulateurs de la voie, activés par le passage du complexe ferri-PVD dans le TBDT FpvA. En bas est représenté l'organisation génomique de la voie PVD. La plupart des gènes sont sous contrôle du facteur sigma PvdS et le transporteur FpvA est sous contrôle du facteur sigma FpvI.

L'expression de toute la voie PVD est soumise à une régulation très fine. Elle est soumise à deux facteurs sigma FpvI et PvdS et leur facteur anti-sigma FpvR. L'expression de ces 3 protéines étant elle-même régulée par Fur (pour *Ferric Uptake Regulator*). Fur est un régulateur transcriptionnel largement représenté au sein du monde bactérien. Chez Pa, la protéine Fur semble jouer un rôle majeur puisque aucun mutant délété de *fur* n'a pu être obtenu et que les mutants conditionnels de ce gène sont difficilement viables (Hassett *et al.*, 1996). Fur est responsable de l'inhibition des gènes impliqués dans l'import du fer lorsque la quantité de fer(II) dans le cytoplasme est suffisante en utilisant ce même fer(II) comme co-facteur. Il est également responsable dans ce même cas de l'activation de l'expression des gènes de stockage du fer en inhibant l'expression de petits ARN régulateurs qui eux même inhibent l'expression des gènes de stockage du fer. En plus des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, Fur est prédit comme contrôlant également l'expression de

gènes impliqués dans la virulence, le métabolisme général, la respiration cellulaire ou encore les réponses aux stress (Visca and Imperi, 2018). La liaison de Fur sur la séquence promotrice des gènes qu'il régule se fait sur une séquence spécifique appelée Fur box (Ochsner and Vasil, 1996).

Lorsque la cellule est en manque de fer, Fur ne va donc pas empêcher l'expression des régulateurs de la voie PVD. PvdS, FpvI et FpvR sont alors exprimés. PvdS et FpvI vont se trouver liés à FpvR, ancré dans la membrane cytoplasmique. Les deux facteurs sigma PvdS et FpvI sont inactifs dans cette configuration. Lorsque le complexe ferri-PVD entre en interaction avec le TBDT FpvA, ce dernier subit alors un changement conformationnel lui permettant d'interagir avec FpvR et de libérer les facteurs sigma PvdS et FpvI (Figure 11). Ils peuvent alors activer les gènes de biosynthèse de la voie PVD et le transporteur FpvA lui-même (Wilson and Lamont, 2000; Rédly and Poole, 2003). Cependant, une petite quantité de ces deux facteurs sigma est retrouvée libre dans le cytoplasme, permettant une expression basale de la voie PVD (Edgar *et al.*, 2017). Cela permet d'initier ensuite au besoin la boucle d'auto-activation de la voie à l'aide du complexe ferri-PVD.

2.2. La pyochéline

La PCH est le deuxième sidérophore endogène de Pa. Elle a été caractérisée pour la première fois en 1981 par Cox et ses collègues (Cox *et al.*, 1981). Elle est souvent considérée comme le sidérophore 'secondaire' de Pa, son affinité pour le fer étant largement inférieure à celle de la PVD ($pFe = 16$, (Brandel *et al.*, 2012)). Cependant ce rôle secondaire de la PCH par rapport à la PVD commence à être remis en question. Ce sidérophore a la particularité de ne pas être exclusif à Pa mais également être synthétisé par certaines espèces du genre *Burkholderia* (Butt and Thomas, 2017a). La PCH est un sidérophore de type hydroxyphenylthiazoline chélatant le fer grâce à deux fonctions amines et alcool (Figure 12) et il lui faut une stœchiométrie de 2 PCH pour chélater un atome de fer. La PCH est capable, avec une affinité moindre, de chélater d'autres métaux que sont le cuivre, l'argent, le cobalt, le nickel et le zinc (Brandel *et al.*, 2012). Au contraire de la PVD, certains complexes PCH-métal peuvent être importé dans la cellule et interférer avec l'homéostasie du fer (Carballido Lopez *et al.*, 2019).

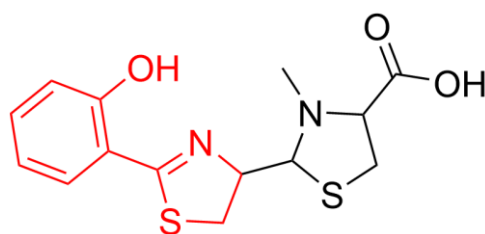


Figure 12 : Formule chimique de la PCH. Le groupement chélateur du fer est coloré en rouge.

La synthèse de la PCH repose elle aussi sur l'utilisation de NRPS. Pour synthétiser la PCH, trois molécules précurseurs sont requises : un salicylate produit par les enzymes PchABD à partir de chorismate et de deux cystéines. Entre ensuite en jeu deux NRPS, PchEF qui vont intégrer les cystéines avec l'aide des enzymes PchCG (Ronnebaum and Lamb, 2018) (Figure 13). Le mécanisme d'export de la PCH n'a à ce jour pas encore été élucidé.

Une fois le complexe ferri-PCH₂ formé, ce dernier va être reconnu par le TBDT FptA. Le complexe va alors se retrouver dans le périplasme où il va pouvoir passer la membrane interne *via* la perméase FptX. Le complexe peut également être dissocié dans le périplasme et le fer(II) pris en charge par le transporteur ABC PchIH (Roche *et al.*, 2021) (Figure 13).

La régulation de la production de PCH est assurée par PchR. PchR est un facteur de transcription de type AraC ayant besoin pour co-facteur du complexe ferri-PCH₂ (Michel *et al.*, 2005). Une fois PchR lié au complexe ferri-PCH₂ il va servir d'activateur pour l'expression des gènes de synthèse et de transport, ainsi que pour sa propre expression (Figure 13). L'expression de tous ces gènes, y compris *pchR* est également soumise à la répression par Fur (Visca and Imperi, 2018). Dû à ce rôle 'secondaire', et au fait que ce sidérophore ne fluoresce pas (ce qui ne facilite pas son étude), cette voie a été moins bien étudiée que la voie PVD, que ce soit au niveau des mécanismes de production, d'import ou de régulation.

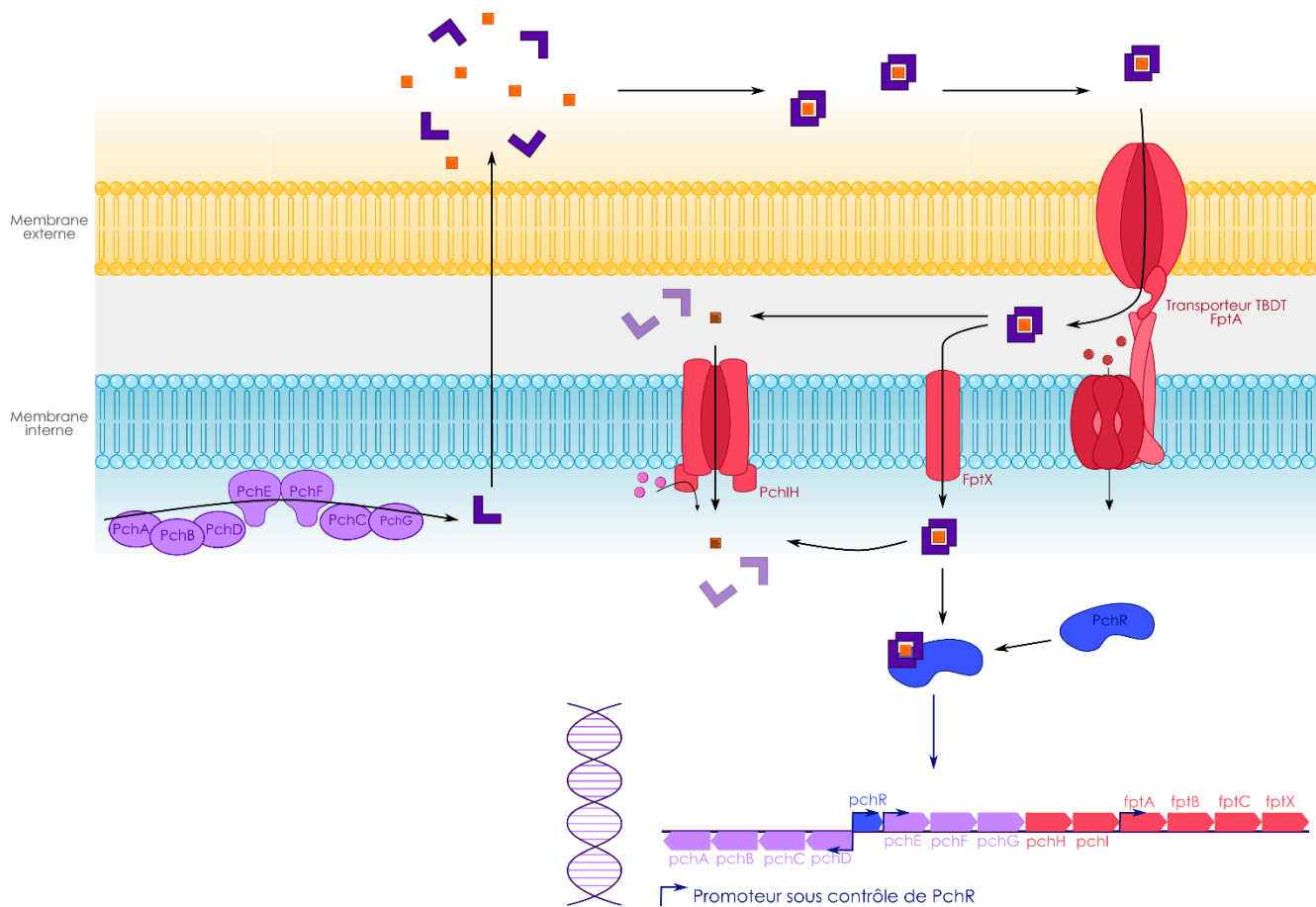


Figure 13 : Représentation schématique de la voie PCH. A gauche en violet, la biosynthèse de la PCH, le mécanisme d’exportation n’est pas encore élucidé, à droite en rouge le processus d’internalisation, en bleu le régulateur PchR. En bas est représenté l’organisation génomique de la voie PCH. Les gènes sont sous le contrôle du régulateur PchR.

3. Autres voies d’import du fer chez *P. aeruginosa*

3.1. Utilisation de l’hème et des protéines chélatrices de fer de l’hôte

Comme décrit précédemment, *Pa*, comme d’autres pathogènes, est capable d’utiliser le fer présent dans l’hème chez l’hôte. Deux systèmes d’acquisition de l’hème ont été caractérisés, Phu (pour *Pseudomonas Heme Uptake*) et Has (pour *Heme Assimilation System*) (Ochsner *et al.*, 2000) (Figure 14 A et B), et un troisième a été identifié récemment : Hxu (Figure 14 C). Ce dernier ne semble en revanche pas aussi important que les deux autres et prendrait plutôt le relais de la voie Has lorsque celle-ci n’est plus fonctionnelle (Otero-Asman *et al.*, 2019). Ces trois systèmes sont sous le contrôle du régulateur Fur (Ochsner *et al.*, 2000).

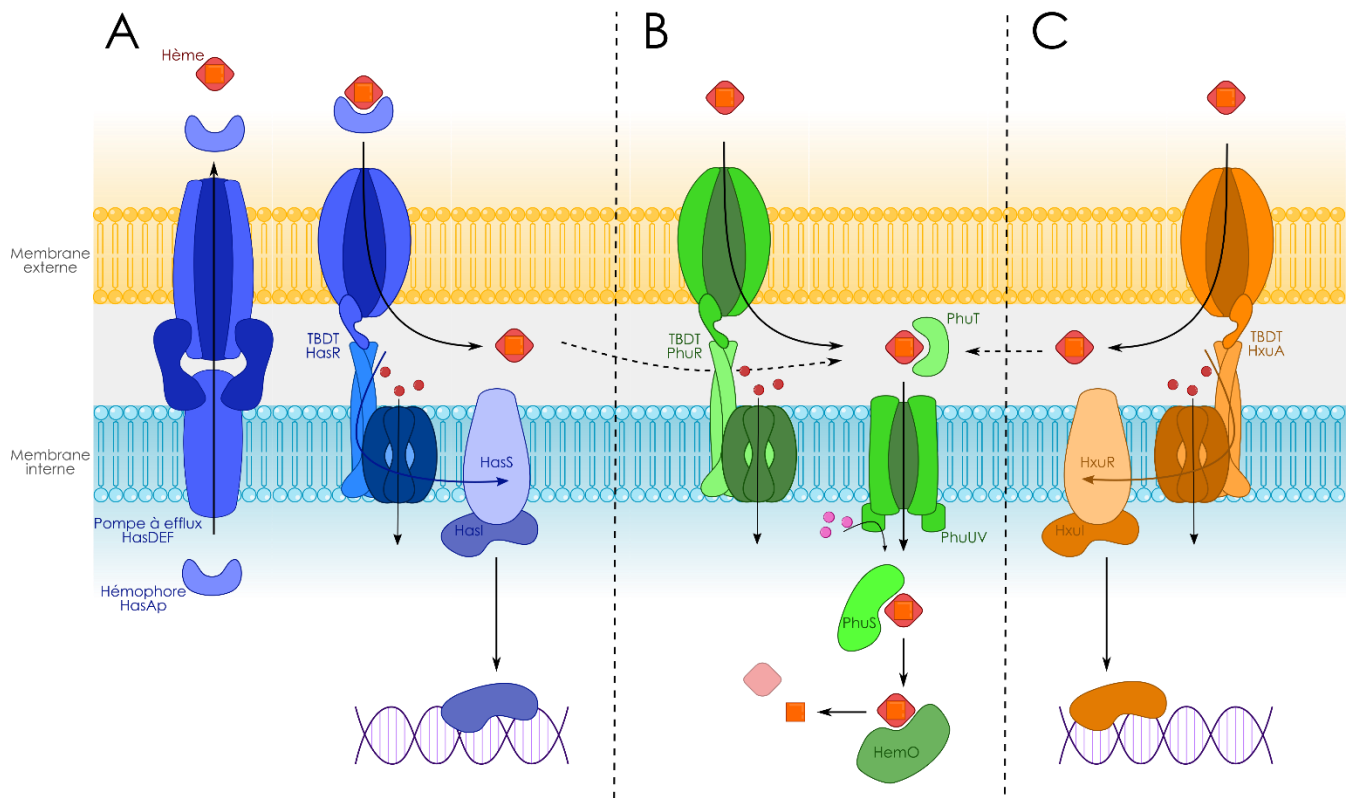


Figure 14 : Représentation schématique des voies de d'acquisition de l'hème chez *Pa* (inspiré de (Normant *et al.*, 2021)). A : voie Has, l'hème est amené au TBDT HasR par un hémophore HasAp sécrété par la pompe à efflux HasDEF, le passage de l'hème dans le TBDT active le régulateur HasI ; B : voie Phu, l'hème passe la membrane externe au travers du TBDT PhuR puis est pris en charge par la protéine PhuT et amené au transporteur ABC PhuUV, une fois dans le cytoplasme l'hème est amené par la protéine PhuS à l'hémolysine HemO qui dégrade l'hème et libère le fer ; C : voie Hxu, l'hème passe la membrane externe par le TBDT HxuA puis est pris en charge par le système Phu, le passage active le régulateur HxuI.

Le système Phu permet à *Pa* d'utiliser directement l'hème qui est transporté jusque dans le cytoplasme où il est dégradé par une oxygénase en biliverdine et relargue le fer sous forme de fer(II) (O'Neill *et al.*, 2012) (Figure 14 B). Le système Has quant à lui peut faire penser au mécanisme des sidérophore. Il fait intervenir un hémophore HasAp sécrété dans le milieu extracellulaire par le biais d'une pompe à efflux où il va chélater l'hème et le rapporter jusqu'à un TBDT. Seul l'hème va passer la membrane externe (Figure 14 A). Une fois dans le périplasme il sera ensuite pris en charge par le système Phu. Cette voie est contrôlée par un couple facteur sigma/anti-sigma, un peu comme le couple PvdS/FpvR, qui va réagir à la présence d'hème dans le milieu et activer l'expression des gènes *has* (Smith and Wilks, 2015; Normant *et al.*, 2021).

Pour ce qui est de la transferrine et de la lactoferrine, *Pa* ne possède pas de système permettant l'utilisation directe de ces protéines, mais la PVD est capable d'entrer en compétition avec la transferrine et ce d'autant plus facilement avec l'aide des protéases LasAB (Wolz *et al.*, 1994; Tostado-Islas *et al.*, 2021).

3.2. Utilisation d'exosidérophores

Durant l'infection, en plus d'être en compétition avec l'hôte pour le fer, *Pa* va également devoir lutter contre les autres microorganismes. Ces autres microorganismes produisent eux aussi des sidérophores et *Pa*, comme d'autres pathogènes tels que *S. aureus* (Endicott *et al.*, 2017) ou *B. subtilis* (Miethke *et al.*, 2013), est capable d'en utiliser. La particularité de *Pa* est qu'elle est particulièrement bien équipée pour l'utilisation d'exosidérophores avec pas moins d'une dizaine d'entre eux dont l'utilisation est possible grâce à un large éventail de TBDT exprimés en fonction des conditions (Cornelis and Dingemans, 2013a; Gasser *et al.*, 2016; Perraud, Cantero, *et al.*, 2020; Normant *et al.*, 2021). Elle est entre autres capable d'utiliser le ferrichrome des *Aspergillus*, l'entérobactine d'*E. coli*, la mycobactine des *Mycobacteria*, le ferrioxamine des *Streptomyces* la vibriobactine de *V. cholerae* ou encore le shizokinen de *B. subtilis*. Ces TBDT sont exprimés de façon basale, ce qui permet à *Pa* d'internaliser rapidement les exosidérophores présents, activant ainsi la voie donnée grâce à un système de régulateurs de type facteur sigma/anti-sigma ou de type AraC. Lorsque ces voies sont exprimées et permettent un import du fer efficace, cela conduit également à la répression des voies endogènes d'import du fer (PVD et PCH) (Gasser *et al.*, 2016; Perraud, Cantero, *et al.*, 2020). Pouvoir utiliser les sidérophores d'autres organismes est ainsi un réel atout pour *Pa*, bien souvent retrouvé dans des environnements polymicrobiens : elle n'a pas besoin de dépenser beaucoup d'énergie à la synthèse de ses propres sidérophores et limite également l'accès aux autres organismes à leurs propres sidérophores et donc au fer.

Il a également été parfois suggéré que *Pa* serait capable d'utiliser des molécules de l'hôte pour acquérir le fer à la façon des sidérophores. Ces molécules sont des catécholamines, des neurotransmetteurs de petite taille et contenant un groupement catéchol telles que la norépinéphrine, l'épinéphrine ou la dopamine. En effet, un effet stimulateur de croissance microbienne en présence de ces neurotransmetteurs est reconnu de longue date (Lyte and Ernst, 1993). D'autres travaux ont ensuite montré que cet effet positif pourrait être dû à leur pouvoir de chélateurs du fer (Siraki *et al.*, 2000). C'est ensuite récemment que leur utilisation à la manière des sidérophores a été démontrée chez *Pa*, *via* l'utilisation de TBDT (Perraud, Kuhn, *et al.*, 2020).

3.3. Utilisation du fer ferreux

Comme décrit plus haut, certaines bactéries Gram négatives sont capables d'utiliser directement le fer(II) *via* le système Feo. Ce système n'a pas été décrit chez Pa, cependant l'existence dans son génome d'un gène (PA4358) codant pour une protéine apparentée à FeoB laisse sous-entendre qu'elle possède un tel système.

4. Pathogénicité de *P. aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose

4.1. Primo-colonisation et infection aiguë

Durant les différentes phases de l'infection, puis de la colonisation des poumons, Pa va exprimer de nombreux facteurs de virulence. Pa est connue pour être dotée d'un nombre particulièrement important de facteurs de virulence, vis-à-vis de l'hôte, mais également pour entrer en compétition avec les autres microorganismes pouvant être présents dans les poumons. Cet arsenal complet lui permet d'être très compétitive et de coloniser des environnements très variés.

Dans le cas des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de CF, Pa va généralement commencer par former une infection dite aiguë, au cours de laquelle elle va exprimer des facteurs de virulences la rendant très invasive et favorisant sa dissémination au sein de l'hôte (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). Parmi ces facteurs de virulence de la phase aiguë sont retrouvés ceux impliqués dans sa mobilité et son adhérence, comme le flagelle, particulièrement immunogène, les pili de type IV permettant l'adhésion aux cellules épithéliales. Sont également exprimés des facteurs impliqués dans la dégradation des tissus, tels que l'exotoxine A, la toxine la plus abondamment produite par Pa durant la phase aiguë, qui induit la nécrose, les élastases LasAB qui ciblent les tissus riches en élastine, l'endoprotéase PrpL (aussi appelée protéase IV) hydrolysant des protéines telles que la transferrine ou encore les rhamnolipides favorisant l'invasion pulmonaire en détruisant les surfactants pulmonaires (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011) (Figure 15).

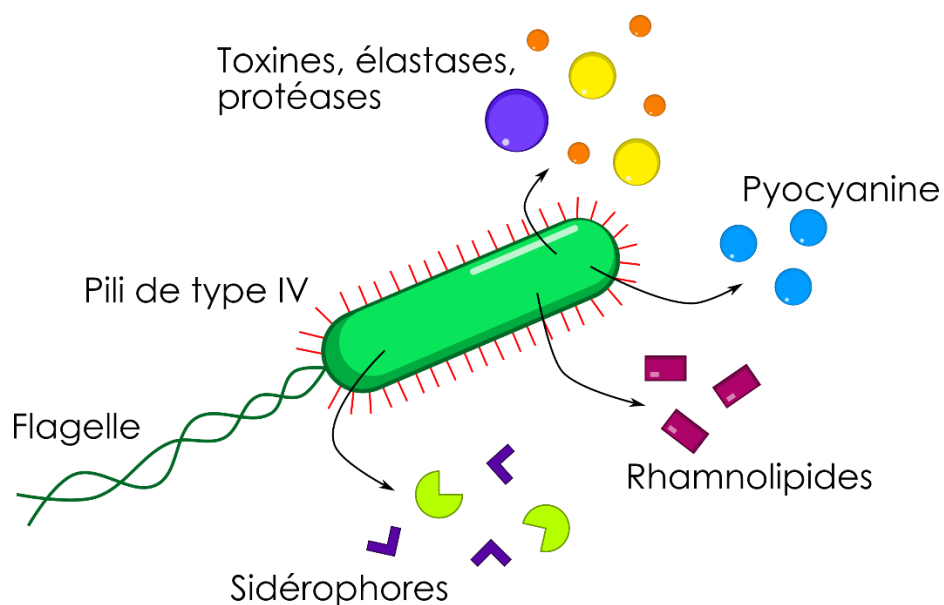


Figure 15 : Exemples de facteurs de virulence exprimés lors des phases d'infection aiguë à Pa. Lors de l'infection aiguë Pa est très mobile et sécrète de nombreuses toxines *via* ses systèmes de sécrétion (type III notamment) ainsi que des molécules de types sidérophores ou phénazines ou encore des rhamnolipides.

Parmi les autres facteurs de virulence exprimés lors de la phase aiguë il est important de mentionner la pyocyanine (Figure 16). La pyocyanine va entraîner des dommages cellulaires graves en inhibant la respiration cellulaire. Elle favorise ainsi la pénétration des tissus pulmonaires, contribue à la lutte contre le système immunitaire en tuant les neutrophiles et donc entraîne une persistance dans les poumons (Lau *et al.*, 2004). La synthèse de la pyocyanine est un processus complexe faisant intervenir deux opérons (*phzABCDEFGHI* 1 et 2) et 3 gènes indépendants (*phzHMS*) et entraînant la formation de nombreux métabolites secondaires intermédiaires plus communément appelés 'phénazines'. La production de pyocyanine est soumise à la régulation par le quorum sensing (QS) (voies Las et Rhl et PQS). En plus d'avoir des effets sur l'hôte, la pyocyanine peut également être utilisée par Pa dans la compétition contre d'autres bactéries pathogènes et plus particulièrement celles non-fermentatives comme *S. aureus* ou *Bacillus spp* (Lau *et al.*, 2004) mais également contre des champignons tel qu'*Aspergillus fumigatus* (Briard *et al.*, 2015). De plus, quelques études tendent à donner un rôle aux phénazines dans l'acquisition du fer en condition d'infection chez Pa. La pyocyanine ainsi que son précurseur PCA (pour *Phenazine-1-Carboxylic Acid*) sont capables de réduire le fer(III) en fer(II) (Wang and Newman, 2008). Cette action permettrait au fer(II) d'être acquis par la voie Feo et favoriserait de ce fait l'acquisition du

fer et même la formation de biofilm, très dépendante des conditions en fer chez Pa (Wang *et al.*, 2011).

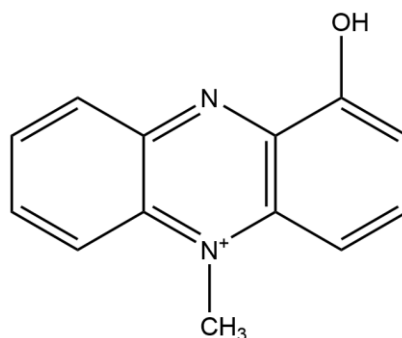


Figure 16 : Formule chimique de la pyocyanine.

Enfin il est essentiel de citer également la PVD, qui en plus de son rôle majeur dans l'acquisition du fer comme décrit plus haut, joue un rôle établi et non négligeable de facteur de virulence (Minandri *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2019). Tout d'abord de par la molécule de PVD elle-même, cette dernière étant un fort chélateur de fer elle entraîne une diminution de la disponibilité en fer pour l'hôte en entrant en compétition avec les protéines de ce dernier. Mais également *via* son régulateur PvdS qui en plus de jouer un rôle dans l'activation de l'expression des gènes de biosynthèse de la PVD a également été montré comme activant l'expression d'autres facteurs de virulence que sont l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL (Ochsner *et al.*, 1996; Wilderman *et al.*, 2001) (Figure 17). De plus, PvdS a également été montré comme jouant un rôle dans la formation des biofilms de types Psl (pour *Polysaccharide Synthesis Locus*) et Pel (pour *Pellicle*) (Banin *et al.*, 2005a) (Figure 17). En revanche son implication dans la formation de biofilm de type alginate n'a pas été démontré, bien que la formation de ce dernier soit sensible à la présence de fer (Wiens *et al.*, 2014a). Une étude a également mis en évidence le possible lien entre PVD et mobilité. En effet une étude a mis en évidence une diminution du swarming (mobilité de surface grâce aux pili) lorsque la voie PVD est délétée mais également qu'en phase de swarming les voies PVD et PCH ainsi que la production de phénazines sont surexprimées (Overhage *et al.*, 2008a). Cela a également été mis en évidence chez *Pseudomonas putida* (Matilla *et al.*, 2007).

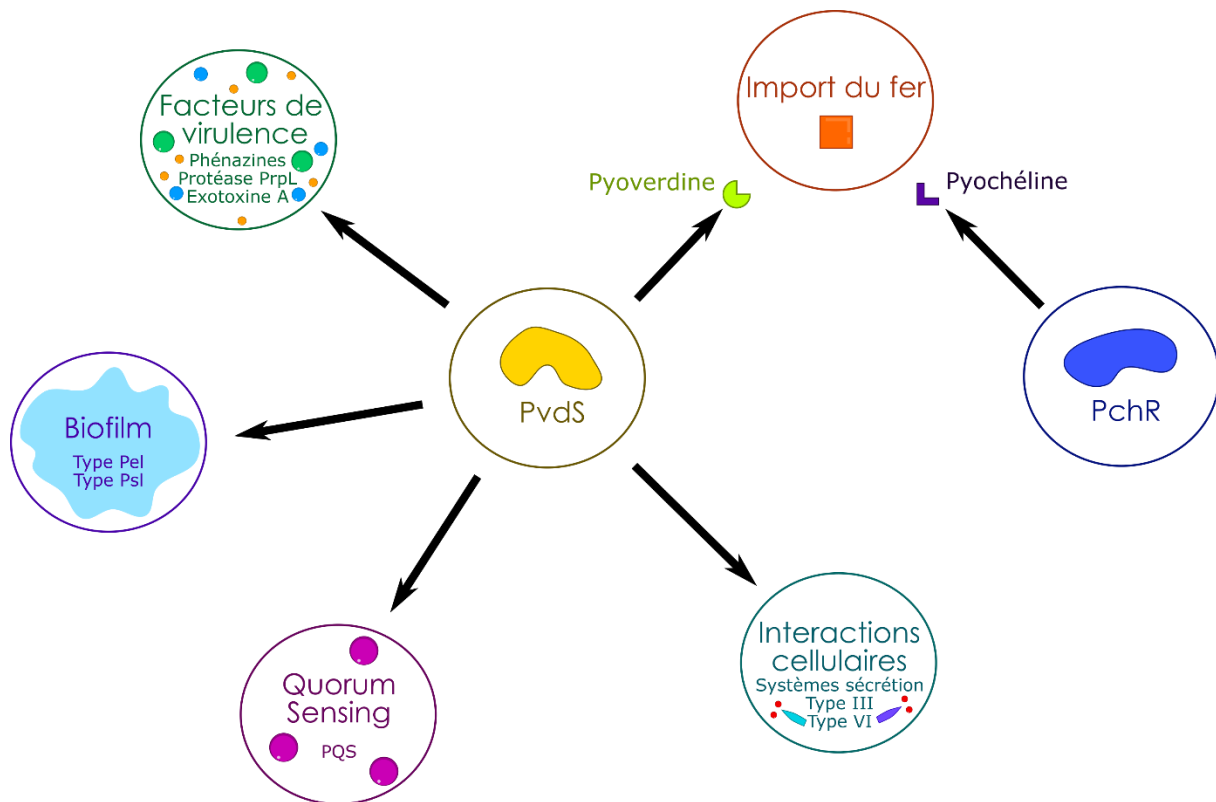


Figure 17 : Représentation schématique de l'influence de PvdS sur les différents aspects de la biologie de Pa. Au contraire de PchR, le régulateur de la voie PCH, PvdS le régulateur de la voie PVD est également impliqué dans le contrôle de l'expression d'autres gènes impliqués dans la virulence, le quorum sensing ou encore les interactions cellulaires et la formation de biofilm (certaines données proviennent d'analyses faites dans notre laboratoire).

Enfin les sidérophores de Pa ont des effets néfastes directement sur les cellules de l'hôte. La PVD est capable de pénétrer dans les cellules, d'y dérégler l'homéostasie du fer ce qui a pour conséquence d'activer le processus de mitophagie, qui est alors chaotique et incontrôlé (Kirienco *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2019). Et la PCH a été démontrée comme pouvant provoquer un fort stress oxydatif (Adler *et al.*, 2012a).

4.2. Evolution dans l'environnement pulmonaire et colonisation chronique

Une fois détectée lors des prélèvements, Pa va être traitée à l'aide d'ATB. Cependant Pa est très résistante et il est difficile d'arriver à l'éliminer totalement. Elle va alors recoloniser régulièrement le patient à partir des sinus où la bactérie est plus protégée du système immunitaire

et moins affectée par les traitements ATB (Folkesson *et al.*, 2012). Elle peut alors commencer à s'adapter de façon transitoire à une colonisation chronique (Figure 18).

Pour s'adapter et coloniser de façon chronique les poumons, Pa va subir de nombreux changements dans son génome et sa physiologie. Comme décrit précédemment, on peut retrouver chez Pa des phénotypes caractéristiques de l'infection chronique tels que les SCV ou les colonies mucoïdes et l'hypermutableté (Cullen and McClean, 2015; Evans, 2015) (Figure 18). L'un des marqueurs de l'infection chronique est la présence de polysaccharide de type alginate, surproduit pour former un biofilm protégeant Pa, typique des colonies mucoïdes (Winstanley *et al.*, 2016). Pa va également voir sa mobilité très réduite, et de nombreux facteurs de virulence vont être sous-exprimés voir complètement éteints. Cela est en partie dû à des mutations dans des gènes régulateurs tels que *lasR*, qui fait partie du QS de Pa et régule de nombreux gènes de virulences, ou encore *retS*, *gacS* ou *mucA* (Winstanley *et al.*, 2016). Le régulateur de la voie PVD, PvdS, est lui-même souvent observé comme muté durant l'infection chronique. La voie PVD est donc inhibée et les sidérophores de façon générale (PVD et PCH) semblent moins exprimés durant l'infection chronique (Konings *et al.*, 2013). Pa va alors utiliser d'autres voies d'import du fer, comme l'utilisation de l'hème par exemple. En voyant l'expression de ses sidérophores diminuée Pa voit également sa virulence diminuée.

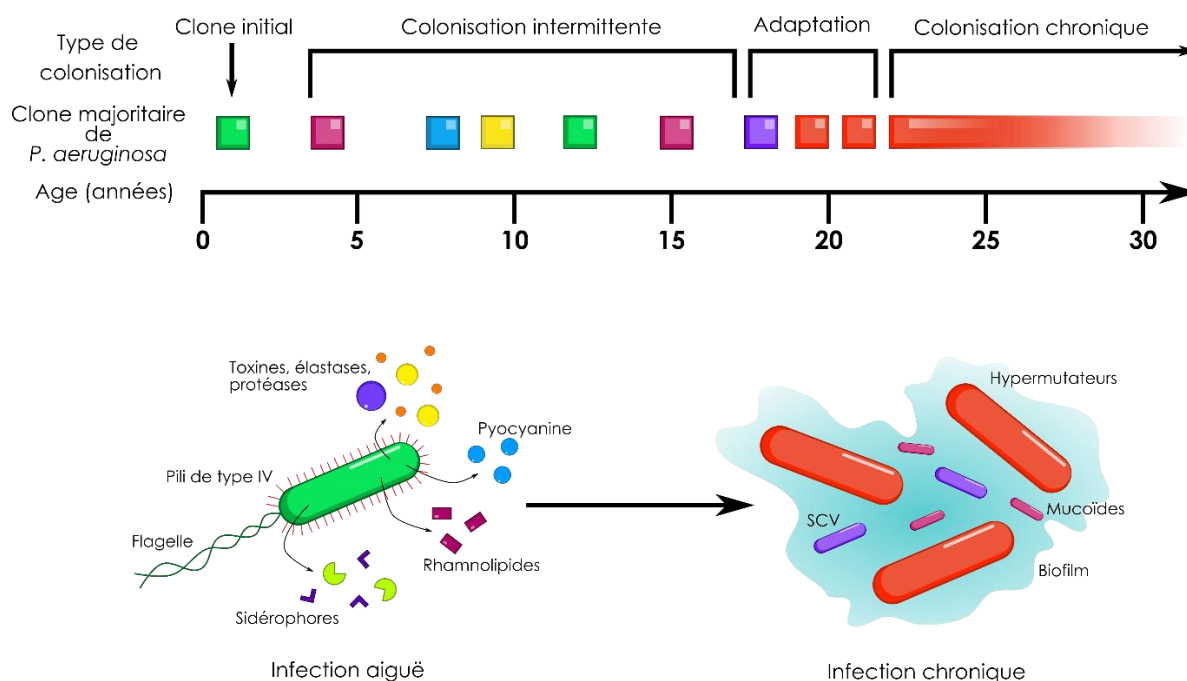


Figure 18 : Evolution de l'infection à Pa dans le cadre des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de CF (inspiré de (Folkesson *et al.*, 2012)). En haut, représentation schématique de l'évolution de l'infection jusqu'à une colonisation chronique des poumons, en bas, état de Pa en phase d'infection aiguë et d'infection chronique.

Mais il serait faux de dire que toute la population de *Pa* présente dans les poumons va évoluer de la même façon et qu'un seul clone sera retrouvé lors des infections chroniques. En effet, il est maintenant bien admis que la population de *Pa* au sein des poumons colonisés chroniquement est très hétérogène. L'évolution va dépendre de tant de paramètres que toutes ne peuvent évoluer dans la même direction. L'évolution va dépendre des micro-environnements, les poumons et le mucus étant un environnement très hétérogène. Les disponibilités en nutriments et les microorganismes voisins ne seront pas les mêmes en fonction de la niche où se trouvent les différents clones (Faure *et al.*, 2018). Dans les poumons des patients CF il est donc possible de trouver à la fois des isolats de *Pa* de type SCV ou mucoïdes, produisant des sidérophores ou non (McGuigan and Callaghan, 2015).

Durant l'infection chronique *Pa* va se développer sous forme de biofilm, ce trait étant particulièrement exagéré dans le cas du phénotype de colonies mucoïdes. La localisation du biofilm peut dépendre en fonction des antécédents du patient, se formant généralement dans la zone respiratoire des poumons, il est plus rare chez les patients traités intensivement aux ATB (Bjarnsholt *et al.*, 2009). Le biofilm de type alginate va être très délétère pour les patients, entraînant une forte inflammation, puis une diminution de la fonction respiratoire (Høiby *et al.*, 2010).

De façon générale, le biofilm, chez *Pa* comme chez toutes les autres bactéries capables d'en structurer un, est un assemblage de microorganismes au sein d'une matrice composée d'exopolysaccharides (EPS) fixé sur un support (Figure 19). La formation de la matrice du biofilm dépend de nombreux paramètres comme l'apport en nutriments, le stress environnemental ou encore la compétition avec les autres microorganismes (Flemming *et al.*, 2016). Cette matrice est très importante car c'est elle qui va protéger les cellules qu'elle contient des agressions extérieures, mais également servir d'interface pour les échanges physico-chimiques. Au sein de la matrice toutes les cellules ne seront pas dans les mêmes conditions, un gradient s'appliquant au sein du biofilm. Les cellules les plus proches de la surface auront accès à plus d'oxygène et de nutriments que les cellules les plus à la base (Figure 19 C). Il est également possible d'observer un gradient de pH voir même de certaines molécules sécrétées comme celles du QS par exemple. Chez *Pa*, l'architecture et la composition du biofilm semblent ne pas uniquement servir à sa protection et à l'apport en nutriment à toutes les cellules mais jouerait également un rôle dans sa pathogénicité (Zhang *et al.*, 2015). Brièvement, le biofilm se forme suite à quatre grandes étapes : les cellules mobiles vont se fixer au support qui servira de base à la formation du biofilm (Figure 19 A) ; les cellules vont commencer à sécréter des EPS et être irréversiblement immobiles (Figure 19 B) ; des micro-colonies vont se former et commencer à créer l'architecture du biofilm ; l'architecture de la matrice va se complexifier (Stoodley *et al.*, 2002) (Figure 19 C). Au sein du biofilm certaines cellules vont

re-exprimer les facteurs de mobilités (Figure 19 D). Elles vont alors se libérer du biofilm, ce qui va leur permettre d'aller coloniser un nouvel environnement (Figure 19 E). C'est cette matrice qui va rendre les infections chroniques à *Pa* particulièrement difficiles à traiter. Les cellules étant protégées, ces dernières sont moins atteintes par les ATB.

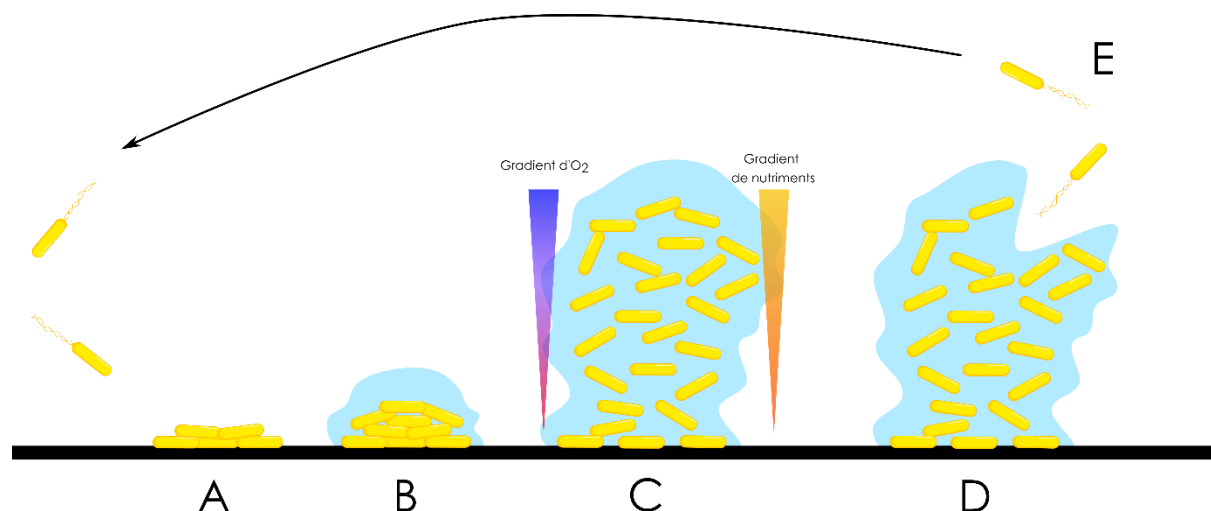


Figure 19 : Représentation schématique des étapes de la formation d'un biofilm chez *Pa* (inspiré de (Stoodley *et al.*, 2002)). A : attachement des cellules au support et perte de la mobilité ; B : maturation du biofilm ; C : biofilm mature à l'architecture complexe, contenant des gradients d'oxygène, de nutriments ou encore de pH ; D : dispersion de cellules mobiles depuis le biofilm pour coloniser un nouveau support.

5. La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*

5.1. Mécanismes d'antibiorésistance

Pa est une bactérie particulièrement résistante aux ATB. Elle fait partie du groupe ESKAPE (pour *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), un groupe de bactéries particulièrement sujettes à l'apparition de souche multi-résistantes et, comme cité plus haut, elle a même été classée parmi les pathogènes de priorité critique pour le développement de nouveaux ATB (aux côtés d'*A. baumannii* et des *Enterbacteriaceae*) (Organisation Mondiale de la Santé, 2017). La forte résistance aux ATB de *Pa* lui est conférée par des propriétés intrinsèques favorisant sa résistance. Elle possède une membrane très imperméable (jusqu'à 100 fois plus basse que celle d'*E. coli*) grâce à la diminution d'expression de nombreuses porines et l'expression de transporteurs plus spécifiques et des pompes à efflux de type RND exprimées de

façon constitutives (MexAB-OprM qui est capable d'effluer les β -lactames, les fluoroquinolones, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, le chloramphénicol et les tétracyclines et MexXY-OprM capable d'effluer le céfépime, les aminoglycosides, les fluoroquinolones, les tétracyclines, le chloramphénicol, le triméthoprim-sulfaméthoxazole et les macrolides) ainsi que 2 β -lactamases (AmpC et Bla_{oxa-50}) (Lupo *et al.*, 2018) (Figure 20). De plus, Pa est insensible au triclosan, un biocide, ce dernier n'ayant tout simplement pas de cible chez les genre *Pseudomonas* (Blair *et al.*, 2015).

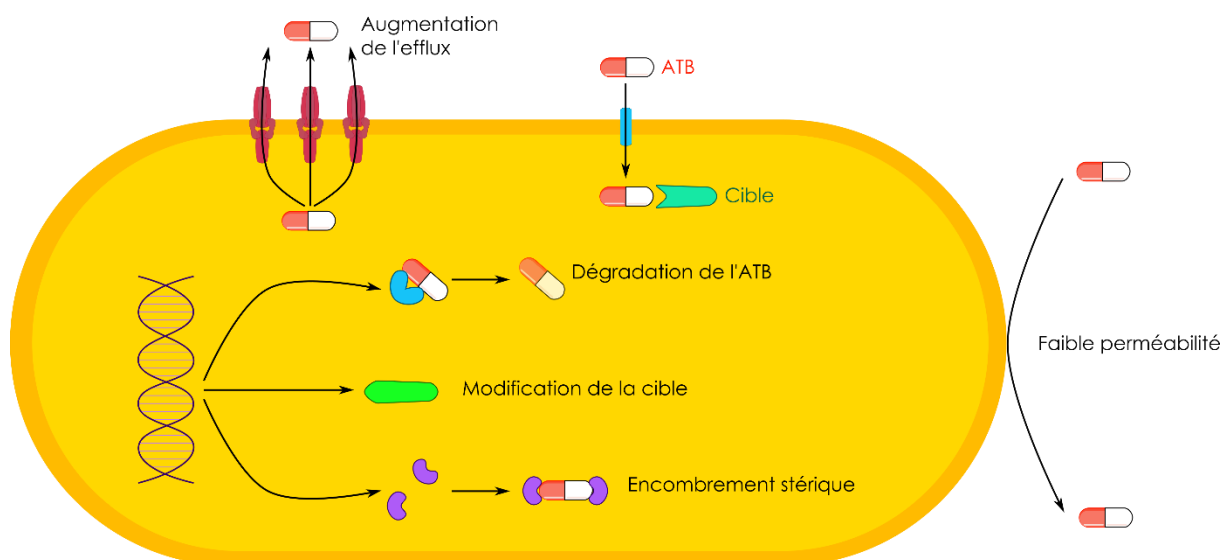


Figure 20 : Représentation schématique des différentes stratégies d'antibiorésistance chez Pa (inspiré de (Alav *et al.*, 2018)). L'efflux de l'ATB peut être augmenté, la perméabilité est faible grâce à peu de porines ou transporteurs aspécifiques exprimés, l'ATB peut être dégradé ou inhibé par encombrement stérique, la cible modifiée.

Le biofilm formé par Pa durant les infections chroniques augmente également sa résistance aux ATB. Le biofilm pourrait permettre de limiter la diffusion des ATB comme c'est le cas pour l'oxygène ou les nutriments, cependant cette caractéristique est très controversée dans la littérature, la diffusion d'un ATB dans une matrice de biofilm dépendant grandement des conditions expérimentales, de la souche bactérienne utilisée et des conditions de croissance (Hall and Mah, 2017). Il a cependant été mis en évidence que sous forme biofilm Pa est beaucoup plus tolérante à la tobramycine et que cela serait bien lié à la matrice du biofilm dans laquelle la tobramycine va se fixer en raison de sa charge positive et donc moins bien pénétrer, du moins jusqu'à un moment donné (Tseng *et al.*, 2013). Il a également été mis en évidence un rôle des polysaccharides de types Psl et Pel dans la résistance à différents ATB (colistine, polymyxine B, tobramycine, ofloxacine pour le type Psl et tobramycine et gentamicine pour le type Pel) (Hall and Mah, 2017). Cela s'expliquerait

par le fait que les polysaccharides séquestrent les molécules d'ATB *via* des interactions électrostatiques. L'ADN extracellulaire (ADNe) présent dans les EPS de la matrice serait aussi impliqué dans une plus forte tolérance aux ATB. Cela serait lié à l'adsorption du magnésium sur les molécules d'ADNe, entraînant une carence en magnésium et diminuant le pH ce qui aurait pour conséquence d'activer les systèmes à deux composants PhoPQ et PmrAB qui semblent entraîner l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux aminoglycosides (tobramycine et gentamicine) et aux peptides antimicrobiens cationiques (colistine et polymyxine B) (Lewenza, 2013; Wilton *et al.*, 2016). Enfin, le fait que les cellules à la base du biofilm soient dans une sorte de phase stationnaire avec un métabolisme réduit pourrait aussi jouer sur leur tolérance vis-à-vis des molécules antimicrobiennes.

Au-delà de ses résistances intrinsèques, *Pa* est également capable d'en acquérir de nouvelles pour s'adapter à la présence d'ATB. Cela peut être dû à des mutations dans certains gènes de résistance ou gènes contrôlant l'expression des gènes de résistance, comme c'est par exemple le cas pour les pompes à efflux dont les voies de régulations peuvent être mutées pour entraîner une surexpression des pompes. Ces mutations peuvent également modifier la cible des ATB, ces derniers ne pourront alors plus s'y fixer mais les cibles garderont tout de même leur fonction (Blair *et al.*, 2015). C'est par exemple le cas pour la résistance à la polymyxine qui cible la production de lipopolysaccharides (LPS) (Fernández *et al.*, 2010). *Pa* peut aussi acquérir des gènes de résistance par transfert horizontal. Elle peut ainsi récupérer des gènes codant pour des enzymes hydrolysant les ATB comme c'est le cas pour les β -lactames, les aminoglycosides ou encore les macrolides par exemple. Ces gènes peuvent également coder pour des enzymes qui ne vont pas hydrolyser mais inactiver l'ATB par modification chimique en ajoutant un groupement ce qui est particulièrement efficace contre les ATB de la famille des aminoglycosides qui sont de grosses molécules comprenant de nombreux groupements hydroxyles et amides exposés (Blair *et al.*, 2015) (Figure 20).

5.2. Alternatives à l'antibiorésistance, stratégie du cheval de Troie et phagothérapie

De plus en plus d'isolats de *Pa* devenant résistants aux ATB administrés et la proportion de souches multirésistantes (MDR pour *Multi-Durg Resistant*) étant en augmentation et préoccupante, il est essentiel de chercher des alternatives. Le développement de nouveaux ATB en est une. Cependant celle-ci a le désavantage d'être fastidieuse et coûteuse pour qu'au final, de

nouvelles résistances soient détectées parfois quelques mois seulement après la mise sur le marché (comme c'est d'ailleurs le cas depuis les premiers ATB).

Une alternative intéressante est de contourner les défenses de la bactérie, de la duper en quelque sorte. Cela peut se faire grâce à l'utilisation de la stratégie du cheval de Troie. Dans ce cas, l'idée est de contourner la faible perméabilité de l'enveloppe de Pa. La molécule ATB est greffée à un sidérophore ou un analogue de sidérophore que la bactérie va alors reconnaître et internaliser (Figure 21 A). L'ATB est alors retrouvé dans le cytoplasme où il peut agir (Mislin and Schalk, 2014). Cette stratégie est assez prometteuse, bien que fastidieuse car les molécules sont complexes à synthétiser. Cependant l'apparition sur le marché du céfidérocol (Shinogi), un conjugué catéchol-céphalosporine actif contre les bactéries Gram négatives en traitement de dernier recours (Sato and Yamawaki, 2019), premier médicament de ce type, a redonné espoir et intérêt dans cette stratégie (Figure 21 B).

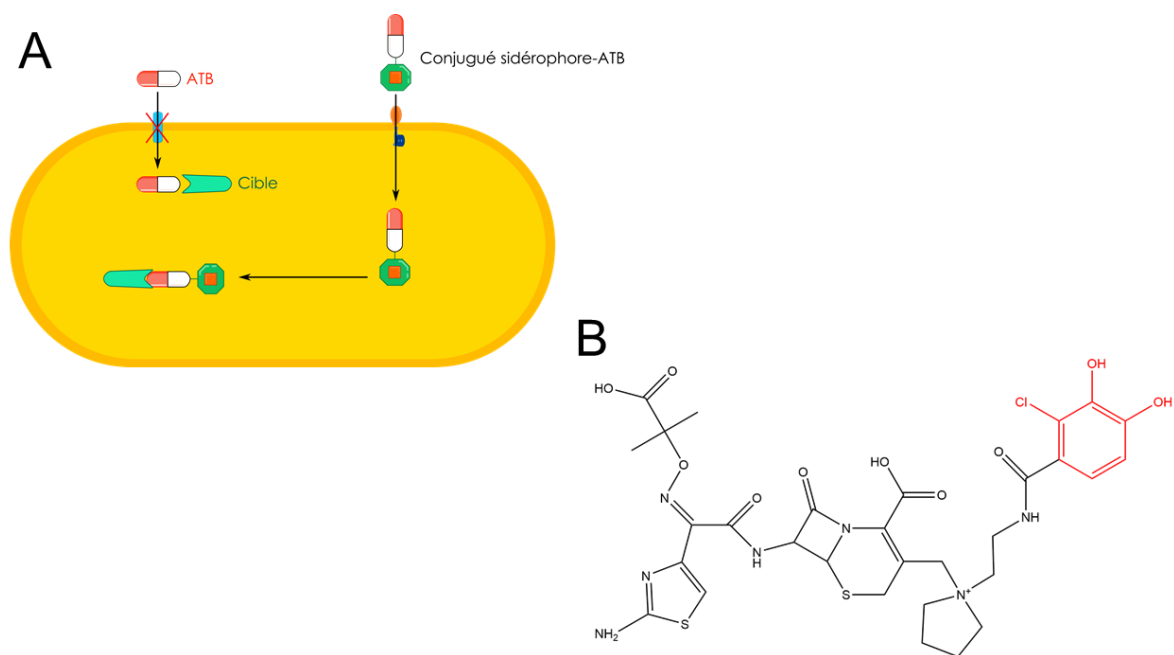


Figure 21 : Représentation schématique de la stratégie du cheval de Troie et première molécule de ce type commercialisée. A : représentation schématique de la stratégie du cheval de Troie, L'ATB passe l'enveloppe de la bactérie lié à un sidérophore pour contourner les défenses ; B : formule chimique du céfidérocol, la partie ATB est représentée en noir et la partie chélatrice de fer (catéchol) est représentée en rouge.

Une autre alternative pourrait être l'utilisation de la phagothérapie. Les phages sont des virus s'attaquant aux bactéries, parfois avec une grande spécificité de l'espèce. Cette alternative

aurait donc les avantages de ne pas dégrader la flore commensale, de limiter le développement de résistances et d'être efficace contre les biofilms. Plus de 137 phages ciblant Pa ont été identifiés à l'heure actuelle (Pires *et al.*, 2015) et de nombreuses études ont démontré leur efficacité *in vitro* contre Pa (Pang *et al.*, 2019). Cependant l'apparition de résistances contre les phages utilisés est l'un des problèmes principaux, amenant au même type de problématique qu'avec les ATB.

Enfin il existe d'autres pistes thérapeutiques, telles que l'inhibition du QS, qui joue un rôle important dans la modulation de la virulence et de la production de biofilm, l'inhibition des lectines permettant l'adhésion de Pa aux cellules épithéliales, l'utilisation de peptides antimicrobiens, d'anticorps monoclonaux ou encore la création d'un vaccin anti-Pa (Thanabalasuriar *et al.*, 2017; Meynet *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2019).

Chapitre IV

Interactions de *P. aeruginosa* avec d'autres bactéries

Que ce soit la toute première fois qu'elle pénètre dans les poumons ou après plusieurs années d'une colonisation devenue chronique, Pa va être confrontée à la présence d'autres microorganismes. Elle va interagir avec ces derniers entraînant des interactions pouvant être bénéfiques mais aussi compétitives. Pa et les autres microorganismes rencontrés dans les poumons vont se retrouver dans les mêmes niches écologiques, être proches physiquement, voire même en contact direct. Elles vont alors être en compétitions pour les divers nutriments disponibles dans le milieu.

1. Interactions avec le microbiote pulmonaire

Bien que pendant très longtemps l'environnement pulmonaire ait été considéré comme stérile, il est aujourd'hui bien admis qu'il contient un microbiote commensal. La flore du tractus respiratoire est complexe et variable selon les organes. Tandis que la flore des voies hautes est composée de genres tels que *Streptococcus*, *Corynebacterium* ou même *Staphylococcus*, les poumons contiennent quant à eux des bactéries pouvant appartenir aux genres *Prevotella*, *Veillonella* ou *Streptococcus* et même des champignons tels que *Eremothecium* ou *Systemostroma* (Bassis *et al.*, 2015; Dickson *et al.*, 2015; Man *et al.*, 2017). Le microbiote pulmonaire est en fait même essentiel à une bonne santé du système respiratoire en ayant un effet barrière contre l'installation des pathogènes (Brown *et al.*, 2017). Il permet également d'éduquer le système immunitaire (Lynch, 2014) et semble même important pour la bonne mise en place de l'architecture des tissus pulmonaires (Yun *et al.*, 2014).

Bien que le microbiote pulmonaire des personnes atteintes de CF soit plus pauvre que celui des personnes saines, plus hétérogène entre les patients et sa composition plus variable en fonction de l'état de l'hôte et des infections, il est tout de même composé de façon globale de nombreux genres bactériens tels que des *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella* ou encore *Porphyromonas* (Huang and LiPuma, 2016). Le microbiote pulmonaire des patients CF contient également des champignons (*Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Kluyveromyces* par exemple) et même des virus (nombreux phages, très similaires entre les patients, *Reticuloendotheliosis*, *Herpesviridae*) (Willner *et al.*, 2009; Willger *et al.*, 2014). Lorsqu'elle va pénétrer dans les poumons, Pa va de ce fait être en contact avec un grand nombre de microorganismes présents naturellement. Les études sur les interactions entre Pa et le microbiote ne sont pas encore très répandues. Cependant certains auteurs se sont intéressés à l'impact de Pa sur le microbiote et il est intéressant de noter qu'il semblerait que lors des infections

à Pa, les bactéries du genre *Porphyromonas* tendraient à disparaître, ce qui indiquerait une forte prédation de Pa vis-à-vis de ce genre bactérien (ce qui pourrait également servir de marqueur pour détecter les infections à Pa) et qu'en fonction de la souche de Pa qui infecte les poumons, la composition du microbiote ne sera pas la même (Keravec *et al.*, 2019; Acosta *et al.*, 2020) et que sa présence tend à faire diminuer la diversité et l'abondance du microbiote au sein des poumons (Bacci *et al.*, 2021). Mais l'impact de cela n'a pas encore été réellement investigué.

2. Interactions avec les autres pathogènes pulmonaires

2.1. Les champignons *Candida* et *Aspergillus*

Bien que dans ce projet de thèse n'aient été investiguées que les interactions entre Pa et d'autre pathogènes bactériens, il me semblait important de mentionner tout de même les deux principaux champignons pathogènes retrouvés dans la CF, d'autant plus en repensant à la genèse première de ce projet dont l'étude des interactions avec Pa devait se concentrer sur les interactions avec des champignons pathogènes plutôt qu'avec d'autres espèces bactériennes.

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux très problématique dans les infections des personnes CF. En effet, pour son développement *A. fumigatus* va dégrader les tissus pulmonaires de façon à accéder aux nutriments. Les interactions entre Pa et *A. fumigatus* sont bien décrites dans la littérature. Pa a un pouvoir antifongique fort sur *A. fumigatus*, notamment grâce à la sécrétion de ses phénazines, de la PVD et de la PCH (Briard *et al.*, 2015, 2019) (Figure 22). Les sidérophores endogènes de Pa sont néfastes à forte concentration pour le champignon, ce qui expliquerait pourquoi sa détection chez les personnes infectées par Pa se fait plutôt lors des infections chroniques. En revanche, il semblerait que l'effet des phénazines soit très dépendant de leur concentration, toxique à forte dose, mais stimulant la production des sidérophores d'*A. fumigatus* lorsqu'elles sont présentes en faible quantité (Briard *et al.*, 2015) (Figure 22). Selon les conditions la présence de Pa n'est donc pas toujours néfaste pour le champignon, des biofilms mixtes entre ces deux organismes ayant même été observés (O'Brien and Fothergill, 2017) et *A. fumigatus* étant stimulé par la présence de composés volatiles produits par Pa et de PCH en faible concentration (Briard *et al.*, 2016, 2019). Enfin, Pa a un avantage important sur *A. fumigatus* au niveau de la compétition pour le fer puisqu'elle est capable d'utiliser le ferrichrome, le sidérophore produit par ce champignon, pour sa propre acquisition du fer (Llamas *et al.*, 2006) (Figure 22).

Candida albicans est quant à elle une levure pouvant être retrouvée de façon commensale dans différentes flores du corps humain mais s'avérant être un pathogène opportuniste capable d'entraîner des infections plus ou moins graves chez les personnes immunodéprimées. La plasticité très développée de *C. albicans* lui confère des capacités d'adaptations très fortes et elle profite généralement d'une diminution de la flore commensale suite à l'utilisation de traitements ATB par exemple pour prendre le dessus rapidement (Poulain, 2015). *C. albicans* peut donc tout à fait se retrouver en présence de Pa dans les poumons. Encore une fois, les interactions entre ces deux microorganismes sont très complexes et bien étudiées (Figure 22). Il a été montré à de nombreuses reprises que Pa et *C. albicans* sont capables de former des biofilms mixtes, Pa se fixant le long des hyphes du champignon (Fourie *et al.*, 2016). Chacune peut avoir une influence sur l'autre, le QS de Pa ayant une influence forte sur la croissance (répression) et la morphologie *C. albicans* et la présence de cette dernière ayant elle aussi un impact sur le métabolisme de Pa, comme le farnesol par exemple (Fourie *et al.*, 2016) (Figure 22). Lopez-Medina et ses collègues ont réussi à mettre en évidence une diminution de la production de PVD et PCH par Pa en présence de *C. albicans* mais n'ont cependant pas réussi à identifier les molécules responsables de ce contrôle (Lopez-Medina *et al.*, 2015). A l'inverse Trejo-Hernandez et ses collègues ont quant à eux observé une surproduction de PVD en présence de surnageant de *C. albicans* (Trejo-Hernández *et al.*, 2014). Les interactions entre Pa et *C. albicans* semblent donc soumises à de nombreux paramètres, certaines études montrant plutôt une diminution de la virulence de Pa en présence de la levure (Ader *et al.*, 2011) et d'autre plutôt un effet d'autant plus néfaste lorsque les deux microorganismes sont présents en même temps (Trejo-Hernández *et al.*, 2014).

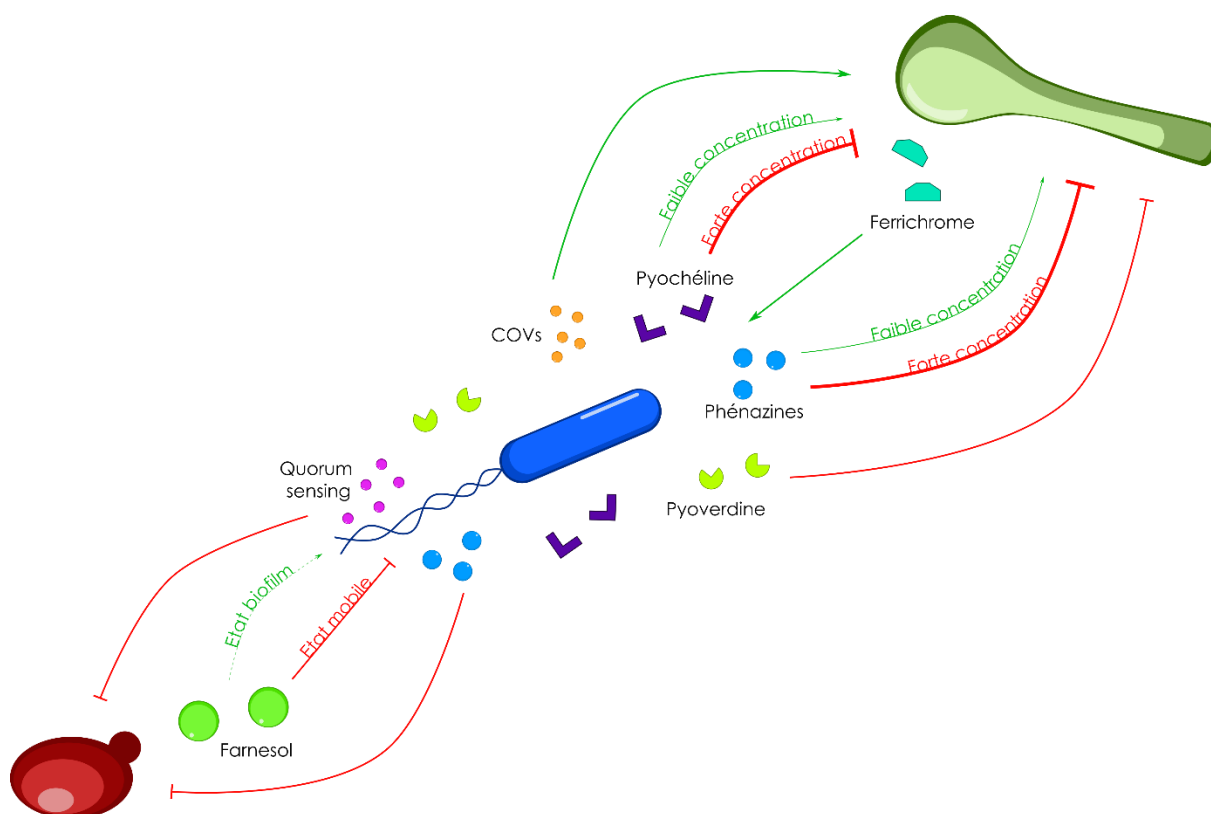


Figure 22 : Représentation schématique des interactions de Pa avec les champignons. *Pa* (en bleue) peut interagir avec *A. fumigatus* (en haut, en vert) et *C. albicans* (en bas, en rouge). Les molécules citées dans le schéma sont une liste non exhaustive des molécules caractérisées dans les interactions entre *Pa* et les champignons.

2.2. La bactérie *Staphylococcus aureus*

S. aureus (Sa) est un coque Gram positif pathogène opportuniste. Il est fréquemment retrouvé dans la flore commensale de la peau et des narines mais du fait de sa pathogénicité et de la proportion croissante de souches très résistantes aux ATB (notamment les souches SARM) entraînant une forte mortalité. Il s'agit de l'un des pathogènes les plus problématiques chez les personnes CF. C'est le pathogène le plus présent lors des infections avec une prévalence pouvant atteindre les 60 à 70 % selon les pays (Cystic Fibrosis Foundation, 2019; Registre français de la mucoviscidose, 2019). Sa infecte en grande majorité les jeunes enfants chez qui il va entraîner une forte inflammation des poumons, entre autres due à la production de β -hémolysines et de coagulases qui vont lyser les tissus pulmonaires et entraîner une baisse importante de la fonction pulmonaire (Wong *et al.*, 2013). Tout comme *Pa*, Sa est capable de coloniser chroniquement les poumons. Le phénotype de SCV est régulièrement observé chez cette bactérie également. En ce

qui concerne son homéostasie du fer, Sa produit deux sidérophores, les staphyloferrines A et B (Hammer and Skaar, 2011) (Figure 23) mais sa source préférentielle de fer en contexte infectieux reste l'hème, pour lequel elle a développé de nombreuses stratégies d'acquisition parmi celles décrites précédemment.

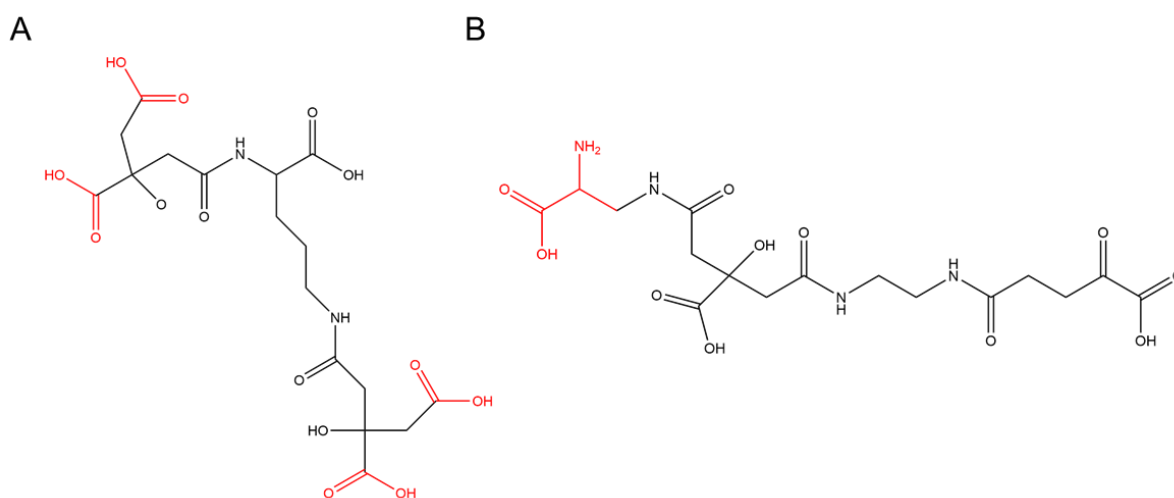


Figure 23 : Formules chimiques des sidérophores de Sa. A : staphyloferrine A ; B : staphyloferrine B. Les fonctions chélatrices sont représentées en rouge.

Les interactions entre Pa et Sa sont particulièrement étudiées, du fait que ces deux bactéries pathogènes sont les plus souvent retrouvées lors des infections et qu'il n'est pas rare de voir des co-infections entre elles (Figure 24). Il semblerait globalement que Sa soit la première à coloniser les poumons, chez les patients très jeunes, puis apparaissent les premières infections à Pa jusqu'à ce qu'elle finisse par supplanter Sa dans les poumons (Registre français de la mucoviscidose, 2019). Les interactions entre ces deux bactéries sont très complexes mais vont globalement plutôt dans le sens d'une compétition. En effet, Pa a une forte activité antibactérienne vis-à-vis de Sa. La protéase LasA par exemple, montre une forte activité anti-staphylocoque (McGuigan and Callaghan, 2015) ainsi que la pyocyanine, les rhamnolipides, ou encore le HQNO (pour 4-Hydroxy-2-heptylQuinoline-N-Oxyde) (O'Brien and Fothergill, 2017) (Figure 24). Pa a même développé des stratégies de détournement du système immunitaire contre Sa en induisant indirectement la production de la phospholipase sPLA2-IL4 par les cellules bronchoépithéliales très efficace contre Sa (Pernet *et al.*, 2014) (Figure 24). Mais Sa n'est pas sans défense contre Pa, elle est entre autre capable de produire une protéine, SpA, inhibant la formation de biofilm chez Pa et la rendant donc plus vulnérable au système immunitaire et aux traitements ATB (Armbruster *et al.*, 2016) (Figure 24). Ces deux bactéries sont également en compétitions pour les nutriments, partageant un set de

15 nutriments indispensables communs (Dunphy *et al.*, 2021). Mais Pa pourrait avoir un léger avantage sur ce point car elle est capable d'utiliser des métabolites produits par Sa comme source de carbone (Camus *et al.*, 2020) (Figure 24).

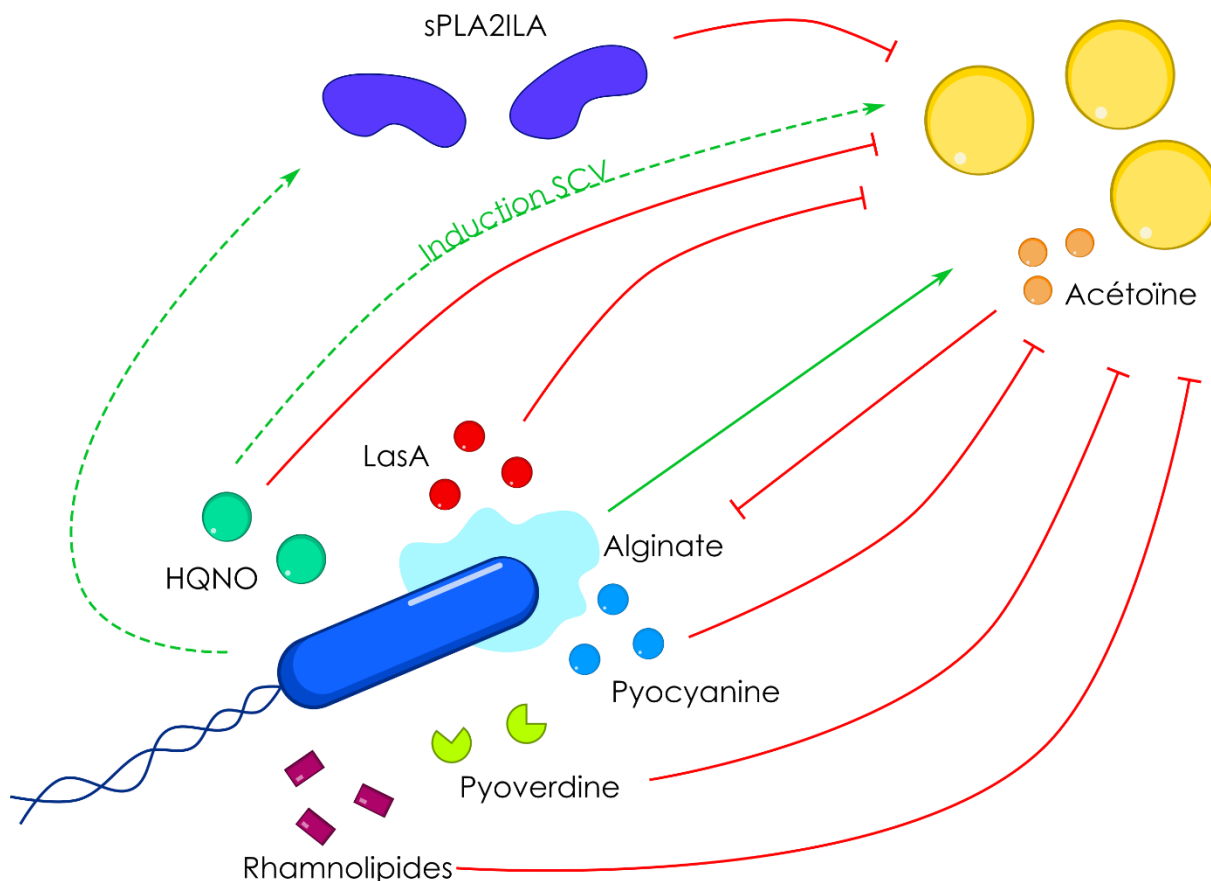


Figure 24 : Représentation schématique des interactions entre Pa et Sa. Pa (en bleu) peut interagir avec Sa (en jaune). Les molécules citées dans le schéma sont une liste non exhaustive des molécules caractérisées dans les interactions Pa-Sa.

Cependant plusieurs études ont également montré que les interactions ne sont pas toujours négatives. Elles sont capables de former des biofilms mixtes, selon le type de biofilm produit par Pa, l'alginate semblant avoir un effet protecteur sur Sa en inhibant l'expression de certains gènes de virulence vis-à-vis de Sa (PVD, rhamnolipides, PQS) (Price *et al.*, 2019). De plus, le HQNO, bien que toxique, semble induire la sélection de SCV chez Sa, ce qui est en soi une forme de résistance à Pa mais induit des bénéfices pour Sa grâce à la sélection de ce phénotype (Mitchell *et al.*, 2010) (Figure 24). Il est également de plus en plus décrit un phénotype de coexistence entre Pa et Sa, où Pa n'inhibe pas la croissance de Sa. Ce phénotype semble plus présent que ce qu'on pensait puisque Briaud et ses collègues ont pu montrer d'après des isolats de personnes CF co-infectées

par Pa et Sa que dans plus de la moitié des cas il s'agissait d'un phénotype de coexistence. Il semblerait que ce phénotype soit surtout dépendant de la souche de Pa présente (Briaud *et al.*, 2019). Dans ce contexte de co-existence il semblerait que Pa affecte tout de même l'expression d'une grande diversité de gènes de Sa, mais sans affecter sa croissance. De plus, il semblerait que la présence de Pa en conditions de co-existence ait un effet sur l'antibiorésistance de Sa (Briaud *et al.*, 2019). Ce phénotype de co-existence se retrouve essentiellement avec des isolats d'infection chronique à Pa. L'évolution de Pa pour coloniser les poumons de façon durable pourrait donc également profiter à Sa. Pa perd alors de nombreux facteurs de virulence comme le HQNO, la pyocyanine, la protéase LasA ou encore la PVD, qui sont néfastes pour Sa et favorisent donc la cohabitation (Camus *et al.*, 2021).

2.3. Les membres du *Burkholderia cepacia* complex

Le Bcc regroupe une vingtaine d'espèces ayant des caractéristiques très similaires parmi lesquelles se retrouvent des espèces pathogènes opportunistes et pouvant causer des infections très préoccupantes, voir fatales, chez les personnes CF. Les espèces le plus souvent retrouvées et problématiques chez les personnes CF sont *B. multivorans* (Bm) et *B. cenocepacia* mais sont également retrouvés *B. cepacia* (Bc) et dans quelques cas *B. gladioli* (Butt and Thomas, 2017a). Ces espèces peuvent causer des infections chroniques asymptomatiques aussi bien qu'un déclin rapide et brutal de la fonction pulmonaire conduisant généralement au décès. Les membres du Bcc s'adaptent particulièrement bien à l'environnement pulmonaire grâce à une large gamme de sources de carbone utilisables ainsi qu'une acquisition du fer efficace grâce à plusieurs voies d'import dont la production de différents sidérophores, l'ornibactine étant le sidérophore principal et commun à tous les membres du Bcc, et pour certaines espèces un sidérophore secondaire (cépaciachéline pour Bm et *B. cenocepacia* ; PCH pour Bc par exemple) (Figure 25), ou encore l'utilisation de l'hème (Butt and Thomas, 2017a). Un auteur, Sokol, a fait des études sur Bc et semble montrer un lien entre la virulence des souches et leur production de PCH. D'après lui, seul 50% des souches de Bc produisent de la PCH, mais sur ces 50 %, 86 % sont des isolats ayant entraîné une infection sévère (Sokol, 1986; Sokol and Woods, 1988). Je n'ai cependant pas trouvé d'études plus récentes. Les membres du Bcc sont également capables de développer des infections chroniques.

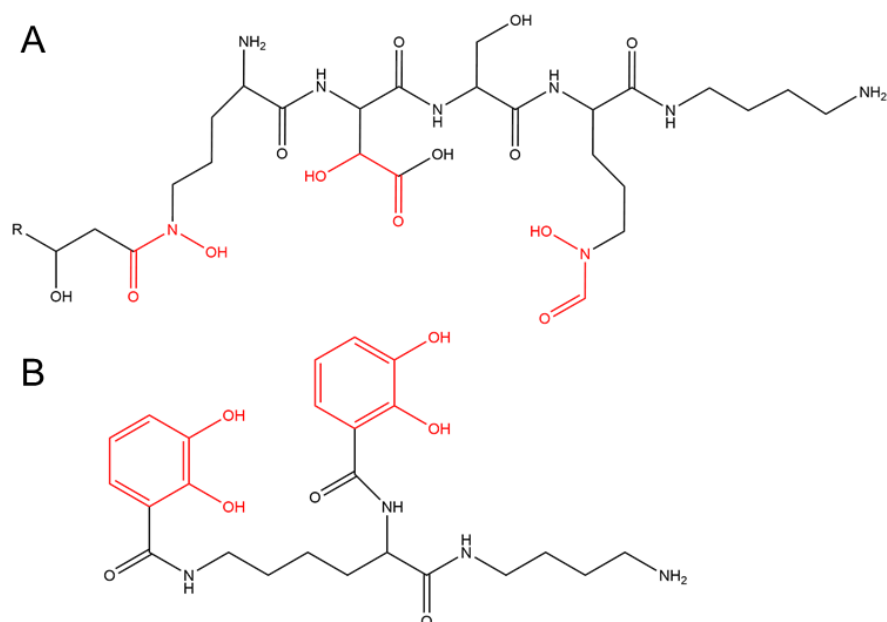


Figure 25 : Formules chimiques de sidérophores présents chez les membres du Bcc. A : ornibactine, commune à tous les membres du Bcc ; **B :** cépaciachéline, présente chez Bm par exemple. Les groupements chélateurs du fer sont représentés en rouge.

Il arrive que Pa et des membres du Bcc se retrouvent lors de co-infections chez les personnes CF. Ces deux genres bactériens sont physiologiquement assez proches, les bactéries du genre *Burkholderia* étant anciennement classées dans le genre *Pseudomonas* et il existe même une forte redondance des gènes impliqués dans l'adaptation entre les deux genres (Traverse *et al.*, 2013). Les interactions entre Pa et les membres du Bcc semblent être principalement de types compétitives (Figure 26). Pa a tendance à être très virulente contre les Bcc. Le système de sécrétion de type VI (SST6), la PVD et des composés principalement sécrétés semblent responsables de cette toxicité (Bragonzi *et al.*, 2012; Costello *et al.*, 2014) (Figure 26). La bactérie du Bcc semblant le mieux résister à Pa est Bm, pour qui seule la PVD semble avoir un réel impact sur le développement. En revanche, les Bcc n'auraient pas un fort impact sur Pa (Bragonzi *et al.*, 2012). Cela peut laisser sous-entendre que Pa peut très bien s'installer dans les poumons alors qu'ils sont déjà colonisés par des membres du Bcc. Mais l'inverse est plus difficile. C'est sûrement pour cela que l'apparition d'infection à des Bcc se fait plutôt lors des infections à Pa devenues chroniques, où cette dernière a perdu en virulence avec entre autre, une diminution de la production de PVD ou de l'expression du SST6 (Perault *et al.*, 2020). Au niveau de l'homéostasie du fer, Pa n'est pas capable d'utiliser l'ornibactine, mais selon les souches, elle peut avoir en commun la PCH. Il serait donc intéressant de voir si, en fonction des souches et des conditions, une synergie n'est pas envisageable. Pour ce qui est de la

PVD, son effet toxique serait sûrement plutôt dû à son fort pouvoir chélateur qu'à un effet direct sur les cellules (Tyrrell *et al.*, 2015).

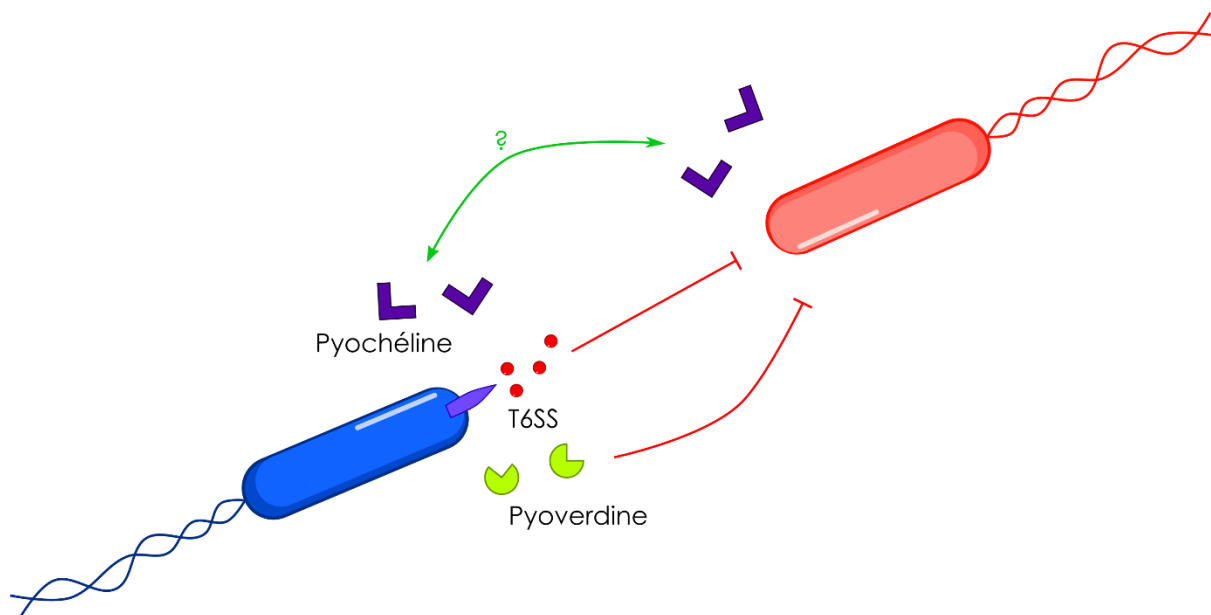


Figure 26 : Représentation schématique des interactions entre Pa et un membre du Bcc. Pa (en bleu) peut interagir avec les membres du Bcc (en rouge). Les molécules citées dans le schéma sont une liste non exhaustive des molécules caractérisées dans les interactions Pa-Bcc.

2.4. Les pathogènes dits ‘émergents’

Certains pathogènes comme Pa, Sa ou les membres du Bcc sont des pathogènes bien connus et identifiés depuis très longtemps dans les prélèvements des patients CF. En revanche, d'autres bactéries pathogènes sont classées dans les pathogènes dits ‘émergents’ du fait que leur identification soit plus récente. Leur apparition peut être expliquée par les méthodes d'identification des germes présents dans les prélèvements qui se sont améliorées et affinées au fil de l'évolution des technologies. Le séquençage a notamment pu permettre de découvrir de nouvelles espèces, qui étaient avant mal identifiées comme étant des *Burkholderia* ou des *Pseudomonas* par exemple ou n'étaient tout simplement pas attribuées à un genre existant (Parkins and Floto, 2015). Mais il faut aussi prendre en compte les paramètres sociaux, environnementaux et médicaux. En effet, avec les progrès de la médecine et une meilleure compréhension de la maladie et des infections, l'espérance de vie des patients CF ayant augmenté au fil du temps, sont d'autres paramètres ayant favorisé la colonisation des poumons par ces nouveaux pathogènes. La pression sélective des traitements ATB, les modes de transmission par exemple, sont des paramètres qui ont pu permettre leur nouvel

apparition dans le spectre des pathogènes pouvant infecter les personnes CF (Parkins and Floto, 2015). Parmi ces pathogènes sont retrouvés *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), *A. xylosoxidans* (Ax), les mycobactéries atypiques ou encore des espèces plus rares telles que *Cupriavidus pauculus* ou *Inqilinus limosus* par exemple. Pour la suite de cette partie je me concentrerai sur Sm et Ax, qui sont les pathogènes émergents que nous avons choisi d'étudier dans ce projet de thèse.

2.4.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

Sm est une bactérie Gram négative ubiquitaire très répandue dans les sols et dans la rhizosphère. C'est un pathogène opportuniste à la physiologie assez proche du genre *Pseudomonas* dont elle faisait d'ailleurs anciennement partie. Sm est moins virulente en comparaison de Pa ou des membres du Bcc mais des liens entre sa présence et une diminution de la fonction pulmonaire et l'augmentation du taux de transplantation ont cependant déjà été établis (Esposito *et al.*, 2017). Mais c'est surtout sa grande résistance intrinsèque aux ATB qui en fait un germe problématique (Brooke, 2012). Comme chez Pa, sa résistance est en partie due à une très faible perméabilité de la membrane mais surtout grâce au nombre très important de pompes à efflux qu'elle possède dans son génome. Pas moins de 31 ont été dénombrées au sein de l'espèce *maltophilia* (Delmar *et al.*, 2014) ce qui lui confère une très forte résistance aux ATB mais également aux métaux (Sun *et al.*, 2014). En plus de cela elle possède d'autres mécanismes pouvant la rendre résistante à une grande variété d'ATB cela entraînant l'apparition de souches MDR. Elle n'est donc pas facilement éliminée des poumons lors des traitements et peut alors développer des infections chroniques. En ce qui concerne l'homéostasie du fer, Sm possède un sidérophore de type catéchol qui ressemblerait à l'entérobactine, mais qui n'a pas encore été caractérisé en détail (Nas and Cianciotto, 2017) et possède un système d'acquisition du fer(II) de type Feo (Pompilio *et al.*, 2014), son génome contient également un système d'acquisition de l'hème (Kalidasan *et al.*, 2018).

Il est relativement commun de trouver des personnes CF dont les poumons sont colonisés à la fois par Pa et Sm. Les personnes ayant ce type d'infections ont souvent un taux de mortalité plus élevé que si elles étaient infectées par chaque bactérie seule, ce qui laisse penser qu'il existe une synergie dans la virulence entre ces deux pathogènes (Yin *et al.*, 2017). Menetrey et ses collègues ont étudié les interactions entre Pa et Sm et ont pu identifier que Pa a un effet négatif sur Sm qui serait plutôt dû à du contact, tandis que Sm a très peu d'effet sur Pa (Menetrey *et al.*, 2020). Il a cependant été montré que son Système de Sécrétion de Type 4 (SST4) est toxique vis-à-vis de Pa (Nas *et al.*, 2021). Mais en co-culture, ces deux bactéries ont tout de même tendance à former du

biofilm mixte et une molécule du QS de Sm le DSF (pour *Diffusible Signal Factor*) a un effet positif sur Pa en stimulant sa production de biofilm ainsi qu'indirectement sa résistance à certains ATB (Yin *et al.*, 2017). Au niveau des interactions pour l'acquisition du fer, cela a été très peu étudié entre Pa et Sm. Sm ne semble pas capable d'utiliser les sidérophores de Pa et celui de Sm étant pour l'instant peu caractérisé, il est difficile de conclure quant à son utilisation par Pa. L'hypothèse qu'il soit utilisé par Pa semble tout de même probable puisqu'il s'agit d'un sidérophore proche de l'entérobactine d'*E. coli* et que l'utilisation de cette dernière par Pa est quant à elle bien décrite (Poole *et al.*, 1990; Perraud *et al.*, 2018).

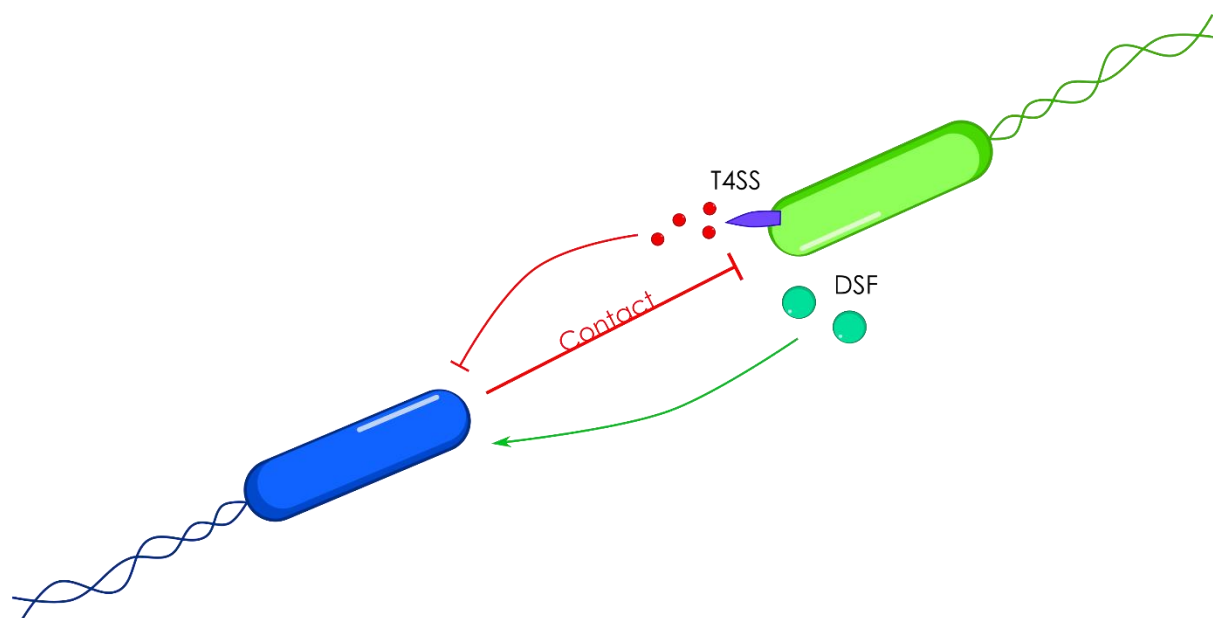


Figure 27 : Représentation schématique des interactions entre Pa et Sm. Pa (en jaune) peut interagir avec Sm (en vert). Pa inhibe la croissance de Sm *via* le contact cellule-cellule et Sm produit une molécule capable de stimuler la production de biofilm de Pa ainsi que d'augmenter sa résistance aux ATB.

2.4.2. *Achromobacter xylosoxidans*

Ax est une bactérie Gram négative ubiquitaire. C'est un pathogène opportuniste, capable de développer des infections telles que des méningites, pneumonies ou encore péritonites chez les personnes immunodéprimées. Une augmentation de la prévalence d'Ax est observée ces dernières années chez les patients CF. Elle est surtout retrouvée chez les patients adultes, d'autant plus lorsqu'ils sont déjà infectés par Pa (Lambiase *et al.*, 2011). Ax est pour le moment un pathogène encore mal connu. Je n'ai par exemple, trouvé aucune information sur son homéostasie du fer. Sa

virulence fait débat mais des études tendent tout de même à lier la présence d’Ax avec une diminution de la fonction pulmonaire et une exacerbation de l’état des patients (Hansen *et al.*, 2010; Edwards *et al.*, 2017; Tetart *et al.*, 2019), bien que ce ne soit pas toujours le cas. Il semblerait également que la présence d’Ax puisse entraîner une diminution de la diversité du microbiote pulmonaire (Talbot and Flight, 2016). Ax est connue pour avoir une forte résistance naturelle aux agents antimicrobiens et former facilement du biofilm, ce qui rend difficile son élimination (Pereira *et al.*, 2017). Elle est également capable de coloniser chroniquement les poumons. Durant cette colonisation, des mécanismes d’adaptation cités précédemment ont été retrouvés tels que l’apparition de souches hypermutatrices, une variabilité génotypique et phénotypique, une diminution de la virulence ou encore la formation importante de biofilm (Khademi *et al.*, 2021; Menetrey *et al.*, 2021).

Ce pathogène étant encore mal connu, les interactions avec les autres microorganismes le sont tout autant. Ax étant très souvent retrouvée chez des patients CF déjà colonisés par Pa, on est en droit de se demander quelles sont les interactions entre ces deux pathogènes. Quelques études ont cependant été faites. Menetrey et ses collègues ont ainsi pu observer une interaction de type plutôt compétitive entre Ax et Pa, Pa ayant un fort effet négatif sur Ax mais cette dernière pouvant également avoir un effet négatif sur Pa (Menetrey *et al.*, 2020). Sandri et ses collègues ont quant à eux également pu observer des interactions plutôt de type compétitives, avec un effet néfaste de la présence d’Ax sur la formation de biofilm chez Pa, mais cela dépendait des isolats testés et que les isolats longitudinaux prélevés plus tard dans l’infection, semblent moins délétères pour Pa (Sandri *et al.*, 2021).

3. Les interactions intra-espèce

Dans les poumons, la population de Pa est hétérogène. Tous les clones ne vont pas exprimer de la même façon les sidérophores. Certains vont en produire, d’autres des quantités limitées et d’autres encore ne vont plus en produire du tout. C’est ce qu’on appelle les ‘*goods and cheaters*’. Les ‘*cheaters*’ sont les bactéries qui ne produisent plus de PVD, mais sont capable d’utiliser celle toujours produite par les ‘*goods*’. Cela entraîne un avantage évolutif pour les ‘*cheaters*’ puisqu’elles ne dépensent pas d’énergie dans la production de PVD mais en profitent toujours pour acquérir le fer (Kümmerli *et al.*, 2015a). Kümmerli et ses collègues ont montré que les ‘*goods*’ vont alors évoluer pour rendre leurs produits moins exploitables ou moins disponibles par les ‘*cheaters*’.

mais que ces derniers sont capables de contre-évoluer pour s'adapter encore une fois en améliorant leur accès aux molécules produites par les 'goods'. Il existe donc dans l'évolution une réelle diversité au sein d'une même espèce, même si à l'origine il s'agissait d'un clone unique et cette diversité peut conduire à une compétition intra-espèce (Cramer *et al.*, 2020). Ces micro-évolutions au sein d'un même patient entraînent donc l'apparition d'une communauté hétérogène, dont les différents clones vont pouvoir prendre le dessus en fonction des conditions physiologiques à un moment donné. L'importance et le rôle de ces 'goods' et 'cheaters' fait encore l'objet de nombreuses études, qui permettront de mieux comprendre ces interactions intra-espèces et les mécanismes permettant l'évolution des bactéries.

Objectifs de la thèse

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse. Ce projet a eu pour objectif d'étudier et caractériser plus en détail le rôle que jouent les sidérophores et l'évolution de leur production au cours des infections pulmonaires à *Pa* dans le cadre de la CF dans les interactions avec d'autres bactéries pathogènes. Ce travail est possible grâce à la caractérisation fine des mécanismes de synthèse, import et régulation des voies d'acquisition du fer menée au laboratoire des Drs I. Schalk et G. Mislin depuis maintenant plus de dix ans.

Pour atteindre cet objectif nous avons tenté de nous rapprocher des conditions d'infection en adaptant les milieux de culture et les souches étudiées. Nous avons eu la chance de recevoir une collection d'isolats cliniques de *Pa* issus directement d'expectorations de patients atteints de CF de la part du Dr N. Cramer. Cette collection comprend des isolats issus de mêmes patients et prélevés au cours du temps nous permettant de suivre l'évolution de ces différentes lignées (dont la caractérisation fait l'objet du chapitre III de partie résultats), en nous concentrant plus particulièrement sur leur production de sidérophores. Nous avons également eu la chance de recevoir une collection d'autres pathogènes bactériens issus d'expectorations de patients CF de la part du Dr A. Doléans-Jordheim afin de confronter nos souches cliniques de *Pa*. Pour notre travail nous avons choisi de 'mimer' les conditions d'infection en nous concentrant uniquement sur le fer afin, dans un premier temps, de nous attacher le plus possible sur cet aspect de l'infection et de commencer avec des conditions de croissance simplifiées.

Ces résultats de thèse tentent de répondre aux questions suivantes :

I : Pour bien comprendre tout ce contexte, il est également important de s'intéresser plus en détail aux mécanismes de régulation de ces voies sidérophores. Certains aspects de la régulation des sidérophores, et plus particulièrement de la PCH restent flous. Il est important, pour comprendre l'impact de ces molécules sur les interactions et la possible résistance aux ATB de connaître en détail la régulation de leur expression.

II : Quel rôle jouent les sidérophores dans les interactions de *Pa* avec les autres bactéries pathogènes ? Le rôle des sidérophores dans l'import du fer et la virulence de *Pa* vis-à-vis de l'hôte est totalement admis. Ces deux rôles sont-ils également importants pour les interactions bactérie/bactérie ? Cela pourrait-il nous éclairer d'avantage sur l'évolution que subissent les voies sidérophores durant l'infection ?

III : D'autres facteurs entrent-ils en jeu dans l'évolution de la production des sidérophores durant l'infection ? Quel est l'impact des traitements ATB que subissent à répétition les patients sur les voies des sidérophores ? Et à l'inverse, l'évolution de la production des sidérophores peut-elle avoir un effet sur l'ATB-résistance des souches

Partie II

Résultats expérimentaux

Chapitre I

**Vers une meilleure compréhension du
rôle de la pyochéline dans l'infection**

1. Résumé de l'article

La voie PVD a été particulièrement bien décrite au cours des dernières années, aussi bien du point de vue mécanistique que de sa régulation. La voie PCH quant à elle, a été beaucoup moins étudiée. La PCH est une molécule au pouvoir chélateur beaucoup plus faible que la PVD et de ce fait son importance dans l'import du fer a tendance à être négligée, d'autant plus en contexte d'infection.

Sa voie de biosynthèse et son import sont plutôt bien décrits mais sa régulation beaucoup moins. Il a cependant été montré que la voie de biosynthèse et l'import de la PCH sont sous le contrôle du régulateur transcriptionnel PchR. Pour activer l'expression des gènes de la voie PCH, PchR a besoin d'être lié à un co-facteur, comme tous les régulateurs de type AraC, et dans son cas il s'agit de la ferri-PCH₂. Le mécanisme de régulation de cette voie, tout comme celui de la PVD, comprend donc une boucle d'auto-régulation : le ferri-sidérophore est nécessaire pour activer la production du sidérophore. Cependant, ce mécanisme ne permet pas de répondre à deux questions :

1. En l'absence initiale de ferri-sidérophore, comment la synthèse des premières molécules s'initie-t-elle ? Pour la voie PVD, il a été montré qu'il existe des 'fuites' dans cette boucle d'auto-activation, permettant la synthèse des premières PVD, et donc d'enclencher la boucle d'auto-activation (Figure 28).
2. Dans des conditions très carencées en fer, la formation de ferri-sidérophore est compromise, ainsi que son import. L'activation de la boucle d'auto-activation est de ce fait également compromise, alors même que la cellule a un grand besoin de production de sidérophores pour capter les quelques molécules de fer du milieu.

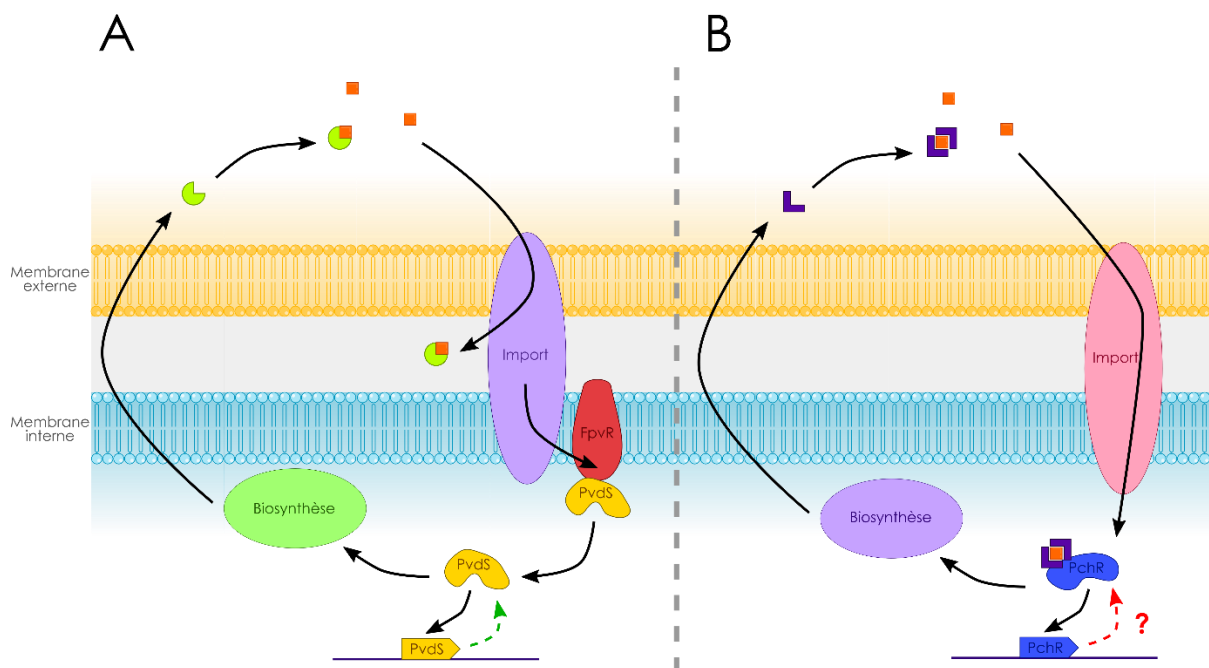


Figure 28 : Représentation de la boucle d'auto-activation des sidérophores chez Pa. A : boucle d'auto-activation de la PVD, PvdS active la biosynthèse de PVD, le complexe ferri-PVD lors de son passage de la membrane externe entraîne la libération de PvdS qui va alors continuer à activer la biosynthèse de la PVD et sa propre expression (flèches noires), mais PvdS peut également être activé sans sa propre présence (fuite, flèche verte) ; B : pour la PCH la boucle fonctionne de la même façon, à ceci près que le complexe ferri-PCH₂ passe dans le cytoplasme et se lie à PchR pour entretenir la boucle (flèches noires), il n'est pas connu si PchR peut être exprimé sans sa propre présence (flèche rouge).

Nous avons ainsi essayé de mieux caractériser la régulation de cette voie PCH, dépendante à la fois de l'activateur PchR et du répresseur Fur.

Il apparaît que la régulation de la voie PCH est plus complexe qu'on ne l'imaginait, ce qui peut refléter une plus grande complexité du rôle joué par ce sidérophore 'secondaire'. Nous nous sommes alors placés dans des conditions plus proches de celles qui peuvent être retrouvées en conditions naturelles (par exemple présence d'autres chélateurs de fer ou de sérum ; variants ne produisant pas de PVD, ...) pour montrer que la PCH pouvait en cas de fort stress ferrique, contourner cette boucle d'auto-activation et/ou pallier l'absence de PVD pour finalement sauver l'approvisionnement en fer de la bactérie.

Ainsi, malgré la nécessité du complexe ferri-PCH₂ pour l'activation de la voie PCH *via* PchR, un évitement de la boucle d'auto-régulation est possible lorsque la bactérie est en difficulté

pour l'acquisition du fer (aucune production de sidérophores). Cette expression est tout de même dû à PchR, malgré l'absence de ferri-PCH₂. PchR seul se lie moins fortement que le complexe PchR-ferri-PCH₂ sur les promoteurs des gènes de la voie PCH, mais permet quand même une expression de la voie. De plus, dans ces conditions de carence en fer, la répression de l'expression des gènes de la voie PCH par Fur est diminuée. Au final, dans des conditions de stress ferrique importantes, même en absence de ferri-PCH₂, la voie PCH est activée à un niveau comparable à la souche sauvage.

Ces données laissent entendre que la PCH pourrait jouer un rôle plus important qu'on ne lui attribuait jusqu'à présent durant l'infection et donc dans la virulence de Pa vis-à-vis des autres microorganismes.

2. Résultats détaillés présentés sous forme d'un article publié



Cite this: *Metallomics*, 2020,
12, 2108

The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges†

Olivier Cunrath,^{‡§^{ab}} Gwenaëlle Graulier,^{§^{ab}} Ana Carballido-Lopez,^{ab}
 Julien Pérard,^c Anne Forster,^{ab} Valérie A. Geoffroy,^{ab} Pamela Saint Auguste,^d
 Dirk Bumann,^d Gaetan L. A. Mislin,^{§^{ab}} Isabelle Michaud-Soret,^{§^c}
 Isabelle J. Schalk,^{§^{ab}} and Pierre Fechter,^{§^{*ab}}

Siderophores are iron chelators produced by bacteria to access iron, an essential nutrient. The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* produces two siderophores, pyoverdine and pyochelin, the former with a high affinity for iron and the latter with a lower affinity. Furthermore, the production of both siderophores involves a positive auto-regulatory loop: the presence of the ferri-siderophore complex is essential for their large production. Since pyochelin has a lower affinity for iron it was hard to consider the role of pyochelin in drastic competitive environments where the host or the environmental microbiota produce strong iron chelators and may inhibit iron chelation by pyochelin. We showed here that the pyochelin pathway overcomes this difficulty through a more complex regulating mechanism for pyochelin production than previously described. Indeed, in the absence of pyoverdine, and thus higher difficulty to access iron, the bacteria are able to produce pyochelin independently of the presence of ferri-pyochelin. The regulation of the pyochelin pathway appeared to be more complex than expected with a more intricate tuning between repression and activation. Consequently, when the bacteria cannot produce pyoverdine they are able to produce pyochelin even in the presence of strong iron chelators. Such results support a more complex and varied role for this siderophore than previously described, and complexify the battle for iron during *P. aeruginosa* infection.

Received 4th February 2020,
Accepted 2nd November 2020

DOI: 10.1039/d0mt00029a

rsc.li/metallomics

Significance to metallomics

Iron is a key element for life; however it is poorly available at physiological pH. To import iron, bacteria evolved siderophores, small molecules secreted by bacteria to chelate iron and trigger its import. The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* produces two siderophores, pyoverdine and pyochelin. Their production is at the heart of bacterial survival, especially during infections where the host deprives the bacteria of iron. Here we provide insights into the regulation of pyochelin production, which help to characterize its role and importance, and provide further information on the battle for iron during an infection.

Introduction

Iron is absolutely required for the growth of most living organisms, including bacteria, in which it is a cofactor for

many enzymes involved in fundamental biological processes. However, iron availability in various aerobic environments is severely limited: iron(II) is rapidly oxidized to iron(III) in the presence of oxygen and precipitates. For bacteria, one of the more commonly used strategies to acquire iron involves the synthesis of siderophores and their release into the environment in order to chelate iron.^{1,2} Siderophores chelate iron(III) in the extra-cellular environment, and the resulting ferri-siderophore complex is then actively transported back into the cell. During an infection, a battle for iron is engaged between the host and the bacteria resulting in an even lower bioavailability of iron. A nutritional immune response is set up by the host to deprive bacteria of nutrients like iron,^{3,4} mainly through the production of different iron chelators like transferrin

^a Université de Strasbourg, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France. E-mail: P.Fechter@unistra.fr

^b CNRS, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France

^c Université de Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IRIG, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, 38000, Grenoble, France

^d Focal Area Infection Biology, Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0mt00029a

‡ Department of Zoology and Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK.

§ Co-first author.

or lipocalin. As counter measures, certain bacteria can produce different types of siderophores, fine-tune their production in this adverse environment, or hijack host heme⁵ and siderophores produced by other organisms.^{5,6}

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen involved in different nosocomial infections and/or in severe infections in patients suffering from cystic fibrosis or from major burns. This pathogen produces two major siderophores, pyoverdine (PVD) and pyochelin (PCH). PVD chelates ferric iron with a higher affinity (10^{32} M^{-1})⁷ than pyochelin (10^{28} M^{-2}).⁸ Since PCH has a lower affinity for ferric iron, it has often been considered as a secondary siderophore, produced mainly to spare PVD, and its role during infections remains unclear.⁹

PVD and PCH production by *P. aeruginosa* is highly regulated by iron bioavailability. The production of both siderophores involves so-called positive autoregulation loops in which PVD-Fe and PCH-Fe are required for their own synthesis (Fig. 1).

The expression of the PVD pathway is induced by two Sigma factors, PvdS and FpvI (reviewed by Llamas and collaborators¹¹). While FpvI only induces the expression of the outer membrane transporter, FpvA, PvdS induces the expression of most other proteins of the pathway. Both Sigma factors are bound by an

anti-Sigma factor, FpvR, which keeps the two Sigma factors inactive.^{11,12} This regulating mechanism also needs that PVD chelates iron, and that the formed PVD-Fe complex is imported back into the periplasm *via* the specific outer membrane transporter, FpvA.¹³ This uptake process induces a change of conformation of the N-terminal end of FpvA which interacts with the anti-Sigma factor FpvR.^{14,15} As a consequence, PvdS and FpvI are released into the cytoplasm, and the expression of the PVD pathway is induced^{10–16} (Fig. 1). Nevertheless, FpvR does not bind the whole pool of PvdS and FpvI, and a part of this pool is still found free in the cytoplasm.^{12,17,18} This ‘evasion’ mechanism allows the synthesis of the first PVD molecules required to activate the autoregulatory loop.^{11,12}

The PCH pathway is activated by a transcription factor, PchR, which belongs to the AraC-type transcription regulator family: to be active, it requires a cofactor, the PCH-Fe complex.¹⁹ Once PCH is synthesized and excreted into the extra-cellular environment, PCH chelates iron (Fig. 1). The PCH-Fe complex is imported back into the periplasm *via* the specific outer membrane transporter, FptA,²⁰ and into the cytoplasm through the permease FptX.²¹ In the cytoplasm, the PCH-Fe complex binds and activates the transcription regulator PchR to trigger transcription of the different genes involved

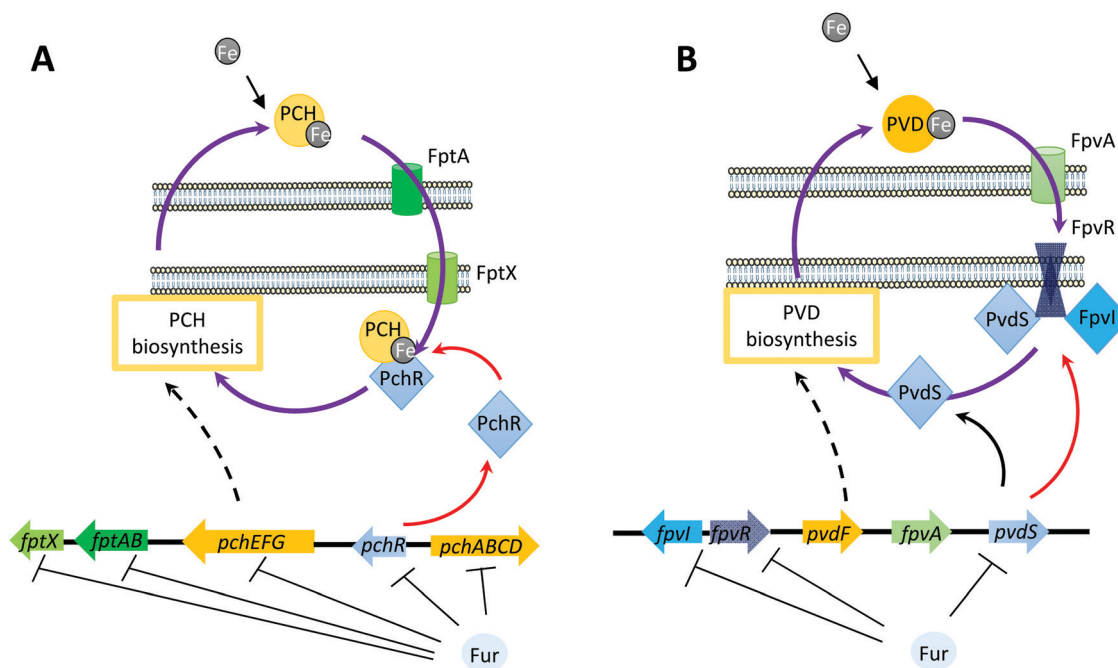


Fig. 1 Schemes of the auto-regulation loops involved in *P. aeruginosa* PCH and PVD pathways. (A) Ferri-pyochelin (PCH-Fe) import system. Once PCH is produced and excreted into the environment, it chelates iron, and PCH-Fe is imported back into the cytoplasm *via* the outer membrane transporter FptA and the permease FptX. In the cytoplasm, the PCH-Fe complex binds and activates the transcription regulator PchR, which activates the expression of the genes of the PCH pathway and consequently the production of PCH. This mechanism sets the PCH autoregulation loop. All PchR proteins are believed to respond to this regulation loop (red arrow). The positive auto-regulation loop is represented by a purple arrow. (B) Ferri-pyoverdine (PVD-Fe) import system. Two Sigma factors PvdS and FpvI induce the expression of most proteins from the system. Once excreted into the environment, PVD chelates iron. PVD-Fe uptake *via* the outer membrane transporter FpvA induces the release of PvdS and FpvI from FpvR, which was keeping the two transcription factors inactive. Consequently the expression of the PVD pathway is activated. This mechanism sets the PVD autoregulation loop. A red arrow indicates the PvdS pool of proteins that are subjected to this regulatory loop. Nevertheless, a part of the PvdS pool does not bind FpvR, and directly activates the expression of genes from the PVD pathway, so that PVD can be produced even in the absence of PVD-Fe. The positive auto-regulation loop is represented by a purple arrow.

in the PCH pathway:^{19,22} the PCH-Fe complex is required for its own synthesis (Fig. 1). In contrast to the PVD pathway, no 'evasion' mechanism has been described so far for the PCH pathway. Thus it is not known how the first PCH molecules are produced, and whether PCH could be produced in conditions in which no PCH-Fe is present.

In replete conditions, *i.e.* enough iron is present in the medium, the expression of the two pathways is repressed by the iron-responsive global transcription regulator Fur.²³ *P. aeruginosa* Fur is part of the tetramer subfamily of Fur proteins and at high iron concentrations, the Fur tetramer is activated by Fe²⁺, which splits into dimers upon DNA interaction and represses the expression of both PVD and PCH pathways.^{24,25} Fur directly binds the promoter of the transcription regulators of the two pathways (*pvdS*, *fpvI*, *fpvR* and *pchR*) and inhibits their production.^{26,27} Fur may as well bind the promoter of other genes of the PCH pathway, but not of the PVD pathway.^{19,28}

In the present work, we investigated whether the expression of the PCH pathway can evade the requirement of PCH-Fe, as it is the case for the PVD pathway. We showed that the expression of the PCH pathway can indeed evade the requirement of PCH-Fe only when PVD is not produced anymore, in a double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ or in a $\Delta pvdS$ mutant, and in the simultaneous presence of iron competitors. We detailed also the regulation of the PCH pathway expression, and discussed the significance of these results.

Materials and methods

Strains used, growth conditions and chemicals

P. aeruginosa and *Escherichia coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 (ESI†). Primers used are listed in Table S2 (ESI†). *E. coli* strains were routinely grown in LB (Difco) at 37 °C. *P. aeruginosa* strains were first grown overnight at 30 °C in LB broth and were then washed, re-suspended and cultured overnight at 30 °C in CAA (casamino acids, Becton Dickinson, 5 g L⁻¹; K₂HPO₄, Merck, 1.4 g L⁻¹; MgSO₄, Merck, 0.25 g L⁻¹) or DMEM (Gibco)/Fetal Bovine Serum (Gibco). When required, gentamycin (30 µg mL⁻¹) was added to *P. aeruginosa* cultures. The cells are then pelleted by centrifugation and re-suspended in fresh CAA medium, and the resulting suspension was diluted to the OD_{600 nm} required. The range of OD_{600 nm} of the cultures, from which normalized values are obtained, are given in Table S3 (ESI†). Desferrioxamine was purchased as a mesylate salt from Sigma, and deferiasirox was synthesised as described by Steinhäuser and collaborators²⁹ (purity checked by mass spectrometry).

Reporter plasmid construction

All enzymes for DNA manipulation were purchased from Fermentas and were used in accordance with the manufacturer's instructions. *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen) was used as the host strain for all plasmids. The DNA fragments from *P. aeruginosa* used for cloning were amplified from the genomic

DNA with Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). The primers used are listed in Table S2 (ESI†).

For the construction of transcriptional reporter plasmids, the promoters of the genes of interest were amplified from the chromosomal DNA of *P. aeruginosa* PAO1 by PCR with specific primers (Table S2, ESI†) allowing an overlapping with a second PCR fragment encompassing the open reading frame of *mcherry*. A second PCR was generated using the two first PCR fragments as a template to obtain the transcriptional reporter fragment. This fragment was trimmed by digestion with *EcoRI* and *HindIII* or *BamHI* and inserted between the sites for these enzymes in pSEVA631 (<http://seva.cnb.csic.es>) and bacteria were transformed with this vector.

CAS assay

4.4 mg of sulfosalicylic acid was added to 5 mL of CAS solution (0.6 mM HDTMA; 0.14 mM CAS; 10 µM FeCl₃; 1 M piperazine, pH 5.6). 100 µL of this solution was dispensed into 96-well plates and 100 µL of the molecule to be tested was added. The molecules tested were dissolved in MeOH at a concentration of 200 µM. After 3 h of incubation at room temperature, the OD_{630 nm} was measured. The reddish solution (without competitor) turned blue when the competitor hijacked iron. The mobilization capacity was estimated as the ratio between the absorbance of the well in which the molecule is added and the absorbance of the control well (100 µL MeOH added). Low values mean high competition. These experiments were repeated 3 times.

Real-time quantification of fluorescence intensity

The cells were cultured overnight in CAA medium, pelleted by centrifugation, re-suspended in fresh CAA medium, and the resulting suspension was diluted to obtain an OD_{600 nm} of 0.01 units. 200 µL of suspension per well was dispensed into a 96-well plate (Greiner, U-bottomed microplate). The plate was incubated at 30 °C, with shaking, in a Tecan microplate reader (Infinite M200, Tecan) for measurements of OD_{600 nm} and mCherry (excitation/emission wavelengths: 570 nm/610 nm) fluorescence at 30 min intervals, for 24 h. When required, iron (500 nM or 5 µM) or gentamycin (30 µg mL⁻¹) was added. When using reporter plasmids carrying the *mcherry* ORF, control experiments were conducted with a plasmid carrying the *mcherry* ORF without any promoter. The results were obtained from three biological replicates. Values at 20 h of growth were taken, and used for histograms. *P*-Values were <0.05.

Siderophore production

Overnight cultures of strains grown in DMEM or CAA medium were pelleted, re-suspended and diluted in fresh medium to obtain an OD_{600 nm} of 0.1. The cells were then incubated, with vigorous shaking, at 30 °C for 8 h. The OD_{600 nm} was taken to measure cell growth. The OD_{400 nm} was also taken from 1 mL of supernatant to measure the production of pyoverdine ($\epsilon_{pvd} = 19\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Pyochelin was then extracted twice from 1 mL of supernatant (acidified with 50 µL of 1 M citric acid) with 500 µL of ethyl acetate. The absorbance at 320 nm was taken, and the pyochelin concentration was calculated

($\epsilon_{\text{pch}} = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As a control, we further compared the absorbance of PVD/PCH purified from our different strains with that of a PVD or PCH-deficient strain, to avoid any interference with other components from the media. These extractions were carried out three times.

Quantitative real-time PCR

Specific gene expression was measured by RT-qPCR, as previously described.³⁰ Briefly, overnight cultures of strains grown in LB or CAA medium were pelleted, re-suspended and diluted in fresh medium to obtain an $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ of 0.1 units. RNA was purified as described previously.³¹ We then reverse transcribed 1 μg of total RNA using a high-capacity RNA to-cDNA Kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The amount of specific complementary DNA was assessed using a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems) with Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the appropriate primers (Table S2, ESI†). The housekeeping gene *uvrD* was used for normalization. The results, obtained from at least three biological replicates, are expressed as a ratio (fold change) relative to the reference conditions. *P*-Values were < 0.05 .

Iron uptake

$^{55}\text{FeCl}_3$ was obtained from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Billerica, MA, USA), in solution, at a concentration of 71.1 mM, with a specific activity of 10.18 Ci g^{-1} . Siderophore- ^{55}Fe complexes were prepared at a ^{55}Fe concentration of 20 μM , with a siderophore : iron (mol/mol) ratio of 20 : 1. Iron uptake assays were carried out three times, as previously described.³²

PVD purification

1 mL of overnight LB culture of wt *P. aeruginosa* (ATCC 15692) was centrifuged (5 min at 9871 g). The pellet was inoculated in succinate medium, and incubated at 30 °C for 24 h with shaking (220 rpm). The pellet, washed twice with 1 mL of sterile succinate medium, was suspended in 1 mL of sterile succinate medium and inoculated in 15 mL of sterile succinate medium and incubated at 30 °C under shaking conditions (220 rpm). After 24 h of growth, 7.5 mL of this culture was transferred into an Erlenmeyer flask containing 1 L of sterile succinate medium. After 24 h of incubation at 30 °C under shaking conditions (220 rpm), the culture was centrifuged (2664g for 40 min). The supernatant was filtered twice using glass microfiber filters (Whatman, GF/C) and once through a nitrocellulose filter (0.45 μm porosity). The amount of pyoverdine present in the solution was estimated by measuring the absorbance at 400 nm. The siderophore containing supernatant was loaded, after acidification (pH 6.0), on a XAD-4 column, washed with two volumes of purified water and eluted with one volume of 50% ethanol. The eluate was concentrated under vacuum on a rotary evaporator and lyophilized.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA experiments were performed as previously described.²⁴ DNA radiolabelling was performed by incubating 20–30 nM

DNA for 30 min at 37 °C in the presence of 1 unit of T4 polynucleotide kinase (NEB) and 0.5 μL of gamma ATP at 1 mCi mmol^{-1} . Labelled DNA was diluted 10 times in binding buffer (20 mM bis-tris Propane pH 8.5, 100 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 μM MnCl_2 , 5% v/v glycerol and 0.01% Triton X-100), desalted on a G25 mini spin column and stored at -20 °C. EMSA was performed with 200–250 pM of freshly prepared radiolabelled DNA incubated for 30 min at 25 °C with different concentrations of protein in a binding buffer. After 30 min of incubation at room temperature, 10 μL of each sample was loaded on an 8% polyacrylamide (29/1) gel in TA buffer (40 mM Tris acetate pH 8.2) with 10% of glycerol supplemented with 10 μM of appropriate metal or in TAE buffer for EDTA treatment (40 mM Tris acetate pH 8.2 and 2 mM EDTA). The gel was pre-run for 30 min at 100 V in TA buffer supplemented with 100 μM of appropriate metal or in TAE buffer. Mobility shifts were revealed by exposing the gels (2 h to 12 h at RT) on a storage phosphor screen (GE Healthcare) and quantified using a cyclone phosphorimager (PerkinElmer). The results were reproduced three times.

Proteomics analysis

Bacteria were grown in CAA medium as described above. After the first overnight culture in CAA medium, the bacteria were diluted in 10 mL of CAA to an $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ of 0.1 and incubated for 8 h at 30 °C. For the digestion and cleanup steps, the same strategy was used as previously described.³³ For the shotgun proteomics assays, 1 μg of peptides of each sample was subjected to LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) analysis using the same approach as previously described.³³

Results and discussion

PCH-Fe is required for PCH synthesis

PchR is an AraC-type of transcription factor, which in most cases requires a co-factor. A previous study showed through *in vitro* studies that PCH-Fe, and not PCH alone, could be the co-factor.¹⁹ As a consequence, as for PVD, the Ferri-siderophore would be required for its own synthesis. We confirmed these *in vitro* results by measuring the level of transcription of genes from the PCH pathway in two mutants of this pathway. The first, $\Delta pchA$,²¹ is unable to synthesize PCH, due to the deletion of *pchA*, a gene encoding an enzyme involved in PCH biosynthesis, Fig. 1 and Fig. S1 (ESI†). The second, $\Delta fptA$,²¹ is unable to import PCH-Fe, due to the deletion of *fptA*, a gene encoding the outer membrane transporter responsible for the import of PCH-Fe. We measured by qRT-PCR the transcription of the mRNAs encoding for PchE, an enzyme involved in PCH synthesis, FptA and FptX, the two transporters involved in the import of the PCH-Fe complex, and the transcription factor *pchR* in the strains wt PAO1, $\Delta pchA$, and $\Delta fptA$, after 8 h of growth in CAA, a strongly iron-depleted medium.³⁴ The transcription of the genes from the PCH pathway was repressed in the strain $\Delta pchA$ (Fig. 2), highlighting the importance of PCH in the induction of its own synthesis. The repression of the

transcription of the genes from the PCH pathway in the $\Delta fptA$ mutant (Fig. 2) further showed that not only the siderophore, but also the ferri-siderophore is required for the activation of the PCH pathway expression. These *in vivo* results confirm those obtained *in vitro* by Michel *et al.* (2005), and clearly establish an auto-regulation of the PCH production through PCH-Fe.

The genes of the PCH pathway are transcribed in a double $\Delta pvdF\Delta pchA$ mutant

To investigate the regulation pattern of the PCH pathway genes, we first measured by qRT-PCR the level of transcription of genes of the PVD and PCH pathway in the strains PAO1 WT, $\Delta pvdF$ ³¹ (a strain unable to produce PVD, due to the deletion of *pvdF*, a gene encoding an enzyme involved in PVD biosynthesis, Fig. 1 and Fig. S1, ESI†) and $\Delta pchA$ ²¹ (a strain unable to produce PCH, due to the deletion of *pchA*, a gene encoding an enzyme involved in PCH biosynthesis, Fig. 1 and Fig. S1, ESI†) after 8 h of growth in CAA, a strongly iron-depleted medium.³⁴

For the PVD pathway, we have chosen to follow the transcription of the mRNAs encoding for *pvdA* and *pvdJ*, involved in PVD biosynthesis, *fvpA*, involved in the import of PVD-Fe across the outer membrane, as well as the sigma/anti-sigma factors *pvdS*, *fvpI*, and *fvpR* regulating the expression of the proteins of the PVD pathway. For the PCH pathway, the expression of the mRNAs encoding for *pchE*, *fptX*, *fptA*, and *pchR* was monitored. The housekeeping gene *uvrD* was used for normalization.

In a strain deprived of PVD ($\Delta pvdF$), the transcription of the different genes from the PVD and PCH pathway was weakly affected (<3 fold changes) when grown in CAA (Fig. 2A and B). These results are in line with the literature and an 'evasion' mechanism allowing a basal production of PVD in the absence of PVD-Fe.^{11,12} Indeed, the induction of gene expression by

PVD-Fe through the auto-regulatory loop (Fig. 1) requires cells to secrete a basal level of PVD to switch on the autoregulation loop of the PVD pathway. In CAA, it even appears that the expression of the PVD pathways in the $\Delta pvdF$ strain is almost similar to that in WT PAO1, suggesting that the production of PVD could be far beyond 'basal' production, even in the absence of PVD-Fe uptake. This production of PVD in the absence of PVD-Fe may thus help to switch on the autoregulatory loop, and also to keep some production of PVD, even when the bacteria faces serious difficulties in PVD-Fe import.

In a strain deprived of PCH, the PVD pathway is expressed as in wt PAO1, while the genes from the PCH pathway were only poorly transcribed in the absence of PCH production (>100 fold difference) (Fig. 2A and B), except that of *pchR*, whose transcription is only regulated by Fur, and not stimulated by the PCH-Fe complex. Such results are in agreement with previous studies showing that PCH-Fe induces the expression of the pathway.^{21,22}

We then used a double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$, deficient in PVD and PCH production (Fig. S1, ESI†). We also measured the level of mRNA expression of both pathways and surprisingly, the genes from both PVD and PCH pathways were still strongly transcribed. Only weak differences of expression of these mRNAs (<3 fold changes compared to WT PAO1, Fig. 2A and B), in the double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ compared to the WT PAO1, were observed.

Our results showed that, as for the PVD autoregulation loop, there is an 'evasion' mechanism that would allow PCH synthesis even in the absence of PCH-Fe. This evasion is switched on only when the bacteria face strong difficulties in iron uptake (here the absence of both PVD-Fe and PCH-Fe), and could help supplying bacteria with iron in these conditions. It also suggests that the regulation of PCH production is more complex than expected.

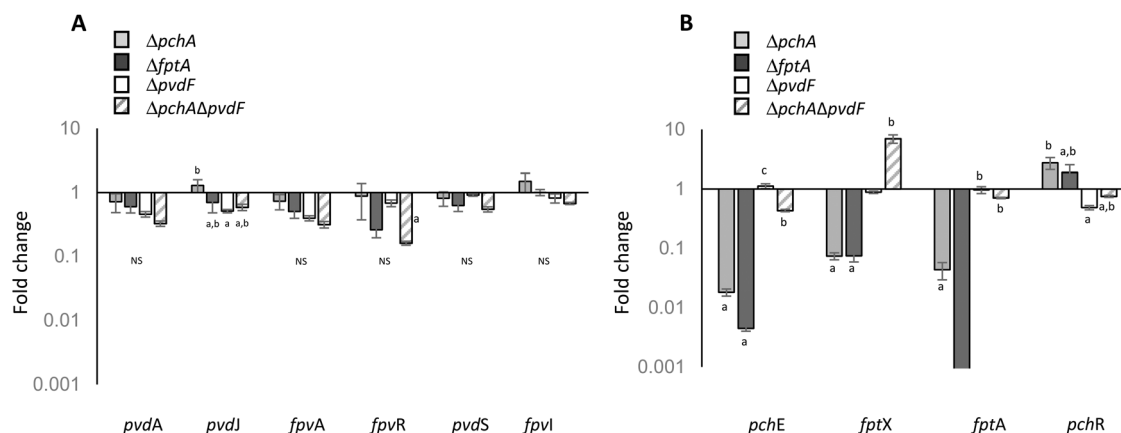


Fig. 2 Transcription of genes from the PVD and PCH pathway in WT PAO1 and in isogenic mutants. (A) Analysis of changes in the transcription of different genes from the PVD pathway (*pvdA*, *pvdJ*, *fvpA*, *pvdS*, *fvpR*, and *fvpI*), and (B) from the PCH pathway (*pchE*, *fptX*, *fptA*, and *pchR*). Reverse transcription qPCR was performed on *P. aeruginosa* WT PAO1 and its isogenic mutants $\Delta pchA$ (unable to produce PCH), $\Delta fptA$ (unable to import PCH-Fe), $\Delta pvdF$ (unable to produce PVD), and $\Delta pvdF\Delta pchA$ (unable to produce both siderophores), grown in CAA medium. The results are given as a ratio between the values obtained for the mutant and those obtained for the WT PAO1 strain, on a logarithmic scale. Bars with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$, one-way ANOVA, three biological replicates).

The transcription of the genes of the PCH pathway in the double $\Delta pvdF\Delta pchA$ mutant depends on PchR

To understand how the PCH pathway expression is restored in the $\Delta pvdF\Delta pchA$ strain, we checked whether Fur could be involved in the phenotype, and then whether PchR or another transcription factor was involved in the phenotype. In a previous study, we have shown that in the $\Delta pchA$ mutant, the iron content was only faintly decreased compared to wt, whereas in the double mutant $\Delta pchA\Delta pvdF$, the iron content was almost two-fold lower.³⁴ Would this decrease in iron concentration affect Fur activity and thus the activation of the PchR pathway? To verify this hypothesis, we compared the proteome of the double mutant $\Delta pchA\Delta pvdF$ and the wt PAO1, to check whether some genes usually repressed by Fur could be upregulated in this context. Nevertheless, among the genes up-regulated in the double mutant $\Delta pchA\Delta pvdF$, we did not find genes already assigned as Fur-dependent (Table S4, ESI†). To study the second hypothesis (involvement of PchR), we created a triple mutant $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pchR$ by deleting *pvdF*, *pchA* and *pchR*. In this mutant grown in CAA, the genes encoding for FptX, PchE, and PchR (as a control) belonging to the PCH pathway were poorly transcribed (Fig. S2, ESI†). These results strongly suggest that the production of the proteins of the PCH pathway in the double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ depends on PchR even if no PCH is produced and consequently no PCH-Fe can interact with PchR.

To confirm that PchR induced directly the expression of the genes from the PCH pathway in the $\Delta pvdF\Delta pchA$ strain, we checked whether the sequence recognized by PchR (PchR box, see Fig. 3A and 4C) of promoters from the PCH pathway genes was involved in their transcription in the double mutant

$\Delta pvdF\Delta pchA$. Two genes were specifically followed up, *pchD*, which encodes an enzyme involved in the biosynthesis of PCH, and *fptA*, which is involved in the transport of PCH-Fe in the periplasm. Four transcriptional fusion plasmids were created, encoding the *mcherry* ORF fused to the promoter of *pchD* or *fptA*, that contained the potential determinants for recognition by PchR and Fur [*p(pchDFurPchR)* and *p(fptAFurPchR)* plasmids] or only by Fur [*p(pchDFur)* and *p(fptAFur)* plasmids] as schematised in Fig. 3A. wt PAO1, the double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ (no PVD and PCH synthesis), but also $\Delta pchA$ (no PCH synthesis) and $\Delta pchR$ (no PCH synthesis and no PchR expression) were transformed with these plasmids, and mCherry production was measured after 20 h of growth in CAA. mCherry produced from the plasmid encoding its ORF fused to the promoter containing the PchR boxes [*p(pchDFurPchR)* and *p(fptAFurPchR)*] was similar in WT PAO1 and in the double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ (or even greater in the latter), much weaker in the $\Delta pchA$ mutant and only faintly expressed in the $\Delta pchR$ mutant (Fig. 3B). The production of mCherry from the plasmids in which no PchR box was present [*p(pchDFur)* and *p(fptAFur)*] was always below the control experiment and was thus not represented in Fig. 3B.

It was previously shown that PCH-Fe was important to activate PchR and trigger the expression of the PCH pathway.^{19,22} Here we showed that the PCH pathway remains still weakly expressed in the single mutant $\Delta pchA$, which is unable to produce PCH. We further showed that this production depended on PchR, on the recognition of the PchR box and its binding to the promoter regions. These results are in line with previous studies showing that PchR alone was still binding, even if very weakly, the

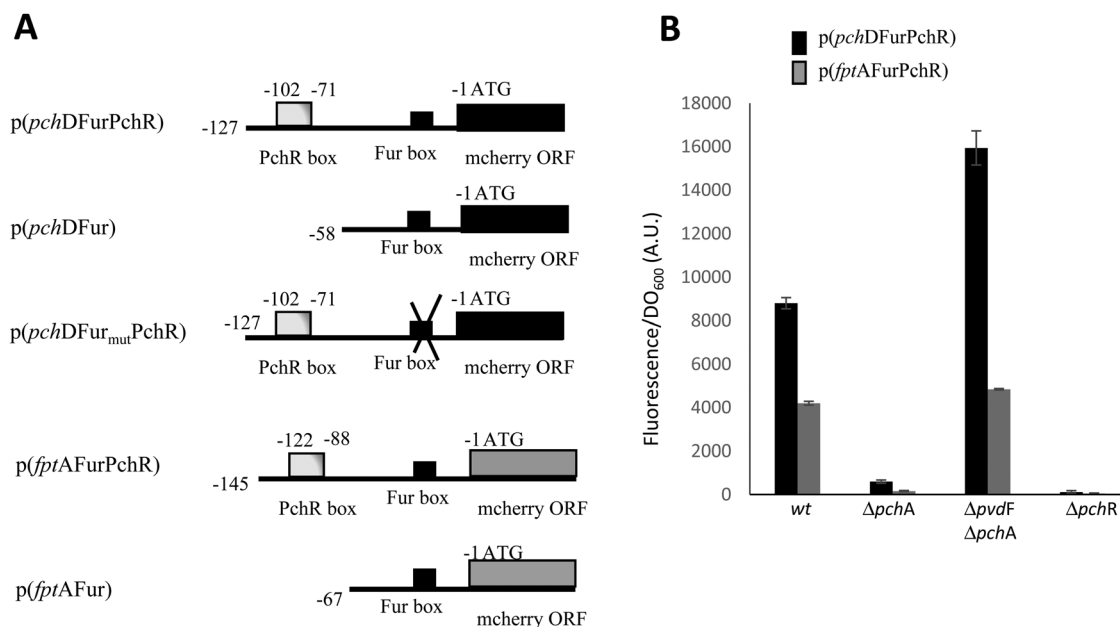


Fig. 3 Expression of transcriptional reporter genes from the PCH pathway in wt PAO1 and isogenic mutants. (A) Schematic representation of the transcriptional reporters used in this study. The *pchR* box is represented, as the *mcherry* ORF (in black, *pchD* derived promoters; in grey, *fptA* derived promoters). (B) The production of mCherry from transcriptional reporter plasmids encompassing the *pchD* (black) or *fptA* (grey) promoters, in wt PAO1, $\Delta pchA$, $\Delta pchA\Delta pchF$, or $\Delta pchR$ backgrounds. mCherry production has been measured after 20 h of growth in CAA, and the results are given as a ratio between fluorescence intensity and OD_{600 nm}. PchE-mCherry expression is followed at 610 nm (excitation at 570 nm).

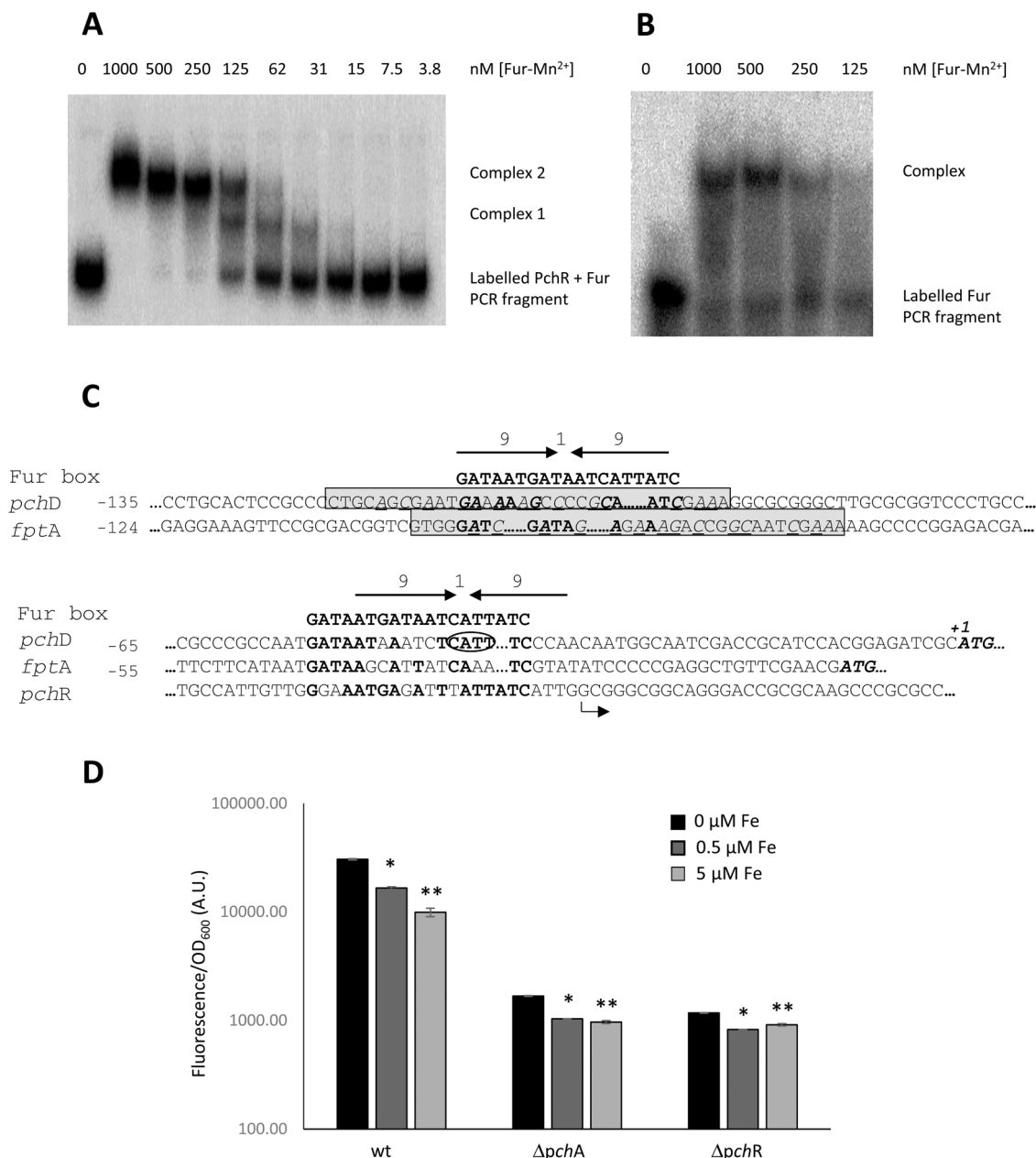


Fig. 4 Fur binding on gene promoters from the PCH pathway. (A) Electrophoretic mobility shifts of a PCR fragment encompassing the PchR and Fur boxes (−145 to −1) of the *pchD* promoter in the presence of Fur or (B) of an oligonucleotide covering only the Fur box. (C) Alignment of the two regions from the *pchD* and *fptA* promoters containing putative Fur determinants, highlighted in bold. One is included into the sequence recognized by PchR (grey boxes), and one overlaps the TATA box. The nucleotides conserved in the PchR box are underlined.¹⁹ The start codon is highlighted in bold italics at the end of the sequences. The Fur box of the *pchR* promoter is given for comparison. For this sequence, the start of transcription is indicated by an arrow. The consensus Fur box is also given and the palindrome is indicated. The encircled sequence CATT from the *pchD* promoter has been mutated in GTAA to inactivate the Fur box in the plasmid p(*pchDFur_{mut}*PchR).³⁰ (D) The production of mCherry from the transcriptional reporter plasmid p(*pchDFur_{mut}*PchR) has been followed, in a PAO1 wt, $\Delta pchA$ and $\Delta pchR$ background. mCherry production has been measured after 20 h of growth in CAA, at increasing iron concentration added at the beginning of the growth. The results are given as a ratio between fluorescence intensity and OD_{600 nm}. PchE-mCherry expression is followed at 610 nm (excitation at 570 nm). Stars indicate that the values are significantly different ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis test or one-way ANOVA).

promoter of some PCH genes.¹⁹ Thus, there could be a ‘basal’ PCH production, even in the absence of PCH. This basal production might be crucial to switch on the autoregulation loop, for which PCH–Fe is required for a full activation of PchR, and a full activation of PCH synthesis.

In the double mutant, we further showed that the restoration of the expression of the PCH pathway depended as well on PchR and on the recognition of the PchR box. Indeed, either the chromosomal deletion of the *pchR* gene or the deletion of the PchR box from the transcriptional reporter plasmids diminished

drastically or even abolished the expression of the PCH effectors. Thus, the high level of PCH pathway expression in the double mutant $\Delta pvdF\Delta pchA$ is due to an induction by PchR, but the precise mechanism remains unknown.

Two Fur boxes lie in the promoters of the PCH effectors

In order to get insight into this mechanism of regulation, we investigated the direct repression of both *pchD* and *fptA* genes by the global iron-responsive regulator Fur. Fur is a global transcriptional repressor, which is activated by Fe^{2+} . It senses any increase in intracellular iron concentrations and transduces this signal into regulation of gene transcription, mainly as a repressor.

In addition to a PchR box, a Fur box has been identified in the promoter regions of *pchD* and *fptA* genes (<https://www.pseudomonas.com/>, schematised in Fig. 3A). We thus checked whether the promoter sequence of these genes was indeed recognized by Fur using electrophoretic mobility shift assay (EMSA). A PCR product encompassing the *pchD* promoter (−135 to −1 from the AUG) with its Fur and PchR boxes was designed, and its capacity to bind Fur was studied. Since Fe^{2+} –Fur complexes are not stable, Mn^{2+} –Fur complexes are usually used.²⁴ This complex was able to bind to the promoter, and surprisingly, two bands were observed, suggesting that two sets of Fur molecules were binding to the PCR product (Fig. 4A). An oligonucleotide covering only the Fur box of the promoter, and not the PchR box, was then used. In that case, one band was observed, suggesting that the PchR box also contained determinants for Fur recognition (Fig. 4B). Consequently, the promoter region of *pchD* may contain 2 different sites containing Fur boxes. By aligning the sequences of the Fur and PchR boxes of *pchD* with the Fur box of *pchR*, some determinants of the consensus Fur promoter were indeed retrieved in both Fur and PchR boxes of the *pchD* promoter (Fig. 4C). We further validated the presence of two Fur boxes in the promoter of another gene from the PCH pathway, *fptA*. Again, some nucleotide determinants of Fur boxes were found. EMSA assays confirmed the binding of Fur to this sequence. In that case, a second band might also be observed right on the top of the first band, but only at a high concentration of Fur (500 μ M) (Fig. S3, ESI†).

It thus appeared that the PchR box is recognized by PchR, and supports activation of gene expression at low iron concentration, when PchR is produced. This box may as well be recognized by Fur and, when iron concentration increases, supports repression of gene expression. To validate this hypothesis, we studied the expression of a transcriptional reporter plasmid that contained only an active PchR box, and no active Fur box. We thus used a plasmid, *p(pchDFur_{mut}PchR)* (Fig. 3A), derived from *p(pchDFurPchR)*. This plasmid contained a 3 nucleotide mutation in the Fur box³⁵ to inhibit its sensitivity to iron (residues encircled in Fig. 4C). This plasmid was used in a wt, $\Delta pchA$ and $\Delta pchR$ background. These constructs allowed an evaluation of the contribution of PchR in the presence of PCH–Fe and Fur, or of PchR and Fur or of Fur only, respectively, to the activation/repression of the PchR box by following the production of the reporter mCherry. We measured mCherry

production after 20 h of growth in CAA, in the presence of increasing concentrations of iron. As shown in Fig. 4D, the production of mCherry was very high in the wt background, confirming the importance of PCH–Fe in the activation of PchR, whereas without PCH–Fe, the expression was much lower, as shown above, and even weaker in the $\Delta pchR$ background. When the concentration of iron increased, Fur got activated, and then either repressed the production of PchR in the wt and $\Delta pchA$ background, and/or repressed directly the production of mCherry by binding the PchR box of the reporter construction. As a consequence, the PCH pathway (and thus mcherry) was less expressed. This inhibition was more pronounced in the wt, in which this pathway was fully activated owing to PCH–Fe. Nevertheless, it is not possible to distinguish between the direct repression of the PchR box of the reporter and the repression of PchR production. In the $\Delta pchR$ mutant, no PchR is produced. The inhibition of Mcherry production that is still observed is thus due to a repression by Fur. This inhibition confirms *in vivo* the repression activity of Fur on the PchR box. There are thus two sequences that trigger sensitivity to iron concentration, probably through Fur, in the promoter region of different genes from the PCH pathway, one of them lying on top of the PchR binding site.

Altogether, these results showed that the regulation of the PCH pathway is far more complex than expected, and that there might be a balance between induction of gene expression by PchR and repression by Fur depending on the intracellular iron concentration. The precise conditions in which these two factors are competing still requires further investigation.

PCH production was repressed by desferrioxamine and deferasirox, in wt PAO1 but not in the mutant $\Delta pvdS$ context

What is the role of the restoration of the PCH pathway expression when both PVD and PCH are not expected to be produced? Are there natural environments in which this may occur? It is known that in cystic fibrosis patients, the bacteria can acquire mutation in the *pvdS* gene (PvdS being the sigma factor activating PVD production), and PVD production be abolished or drastically diminished.³⁶ It is known that *P. aeruginosa* can use iron from heme, or heterologous siderophores,⁶ but what about the PCH pathway? According to the regulation of PCH production, PCH–Fe should be required to fully activate its production. Nevertheless, in a competitive environment (presence of other iron chelators), PCH may not be able to chelate iron anymore, and consequently not be produced either. We show here that it is not the case.

We compared the expression of the PCH system in wt PAO1 and in the *pvdS* deletion mutant ($\Delta pvdS$), in the presence of competitors for iron chelation. We first tested the effect of two iron chelators, desferrioxamine and deferasirox. These iron chelators are FDA approved, used in iron overload illness like hemochromatosis or thalassemia, and already tested to potentiate the inhibition of *P. aeruginosa* infection by other drugs.^{37,38} Desferrioxamine is a siderophore, and is used by *P. aeruginosa* as an iron source. Hence, Ferri-desferrioxamine is recognized by the Fox system.³⁹ This chelator was indeed transported into

P. aeruginosa (Fig. S4A, ESI[†]), and did not present toxic effects in the range of concentrations tested (Fig. S4B, ESI[†]). Deferasirox, on the other hand, is a man-made chemical iron chelator. It might not be transported, but we were not able to confirm that (Fig. S4A, ESI[†]). However, opposite to desferrioxamine, deferasirox becomes toxic at high concentration (>10 mM, Fig. S4B, ESI[†]). We then compared the iron chelation capacity of the different siderophores/chelators. We used the CAS assay for this purpose. This assay is based on the chelation of iron by CAS, which turns reddish. When a competitor is added, the colour turns to blue according to the competition between CAS and the chelator. Thus, this assay provides an idea of the affinity and competition capacity of the different molecules tested. According to this test, deferasirox binds slightly less efficiently iron than PCH, and desferrioxamine has a better mobilization capacity (Fig. S4C, ESI[†]). These results reflect previous ones showing that desferrioxamine could mobilize iron from ferritin better than PCH and even PVD.⁴⁰ PCH may thus weakly compete with desferrioxamine and/or deferasirox, especially when these chelators are added from the beginning of the experiment at high concentration.

Different concentrations of the two FDA approved iron chelators were first added to the medium (1 μ M–10 mM, 2 orders of magnitude higher than the maximal concentration of PVD or PCH produced in CAA), and we studied their effect on the PCH pathway expression. We measured the expression of a protein from the PCH pathway that was chromosomally tagged with mCherry (PchE-mCherry) after 20 h of growth, in the presence of these competitors. The expression of PchE-mCherry decreased with the addition of the two competitors in the wt PAO1 background (Fig. 5A and C). This behaviour was expected, as the addition of iron chelators deprives the medium of available iron, hinders the formation PCH-Fe and thus the activation of the PCH auto-regulation loop. Since the production of mCherry decreased similarly with both iron chelators, it showed that they both induced a similar inhibition of PCH synthesis, and can thus be considered as efficient competitors to PCH. Nevertheless, in the $\Delta pvdS$ mutant, PchE-mCherry expression did not decrease as expected. This expression almost did not decrease when using deferasirox (Fig. 5A), while it decreased more slightly when using desferrioxamine (Fig. 5C), which can be used as an iron source.

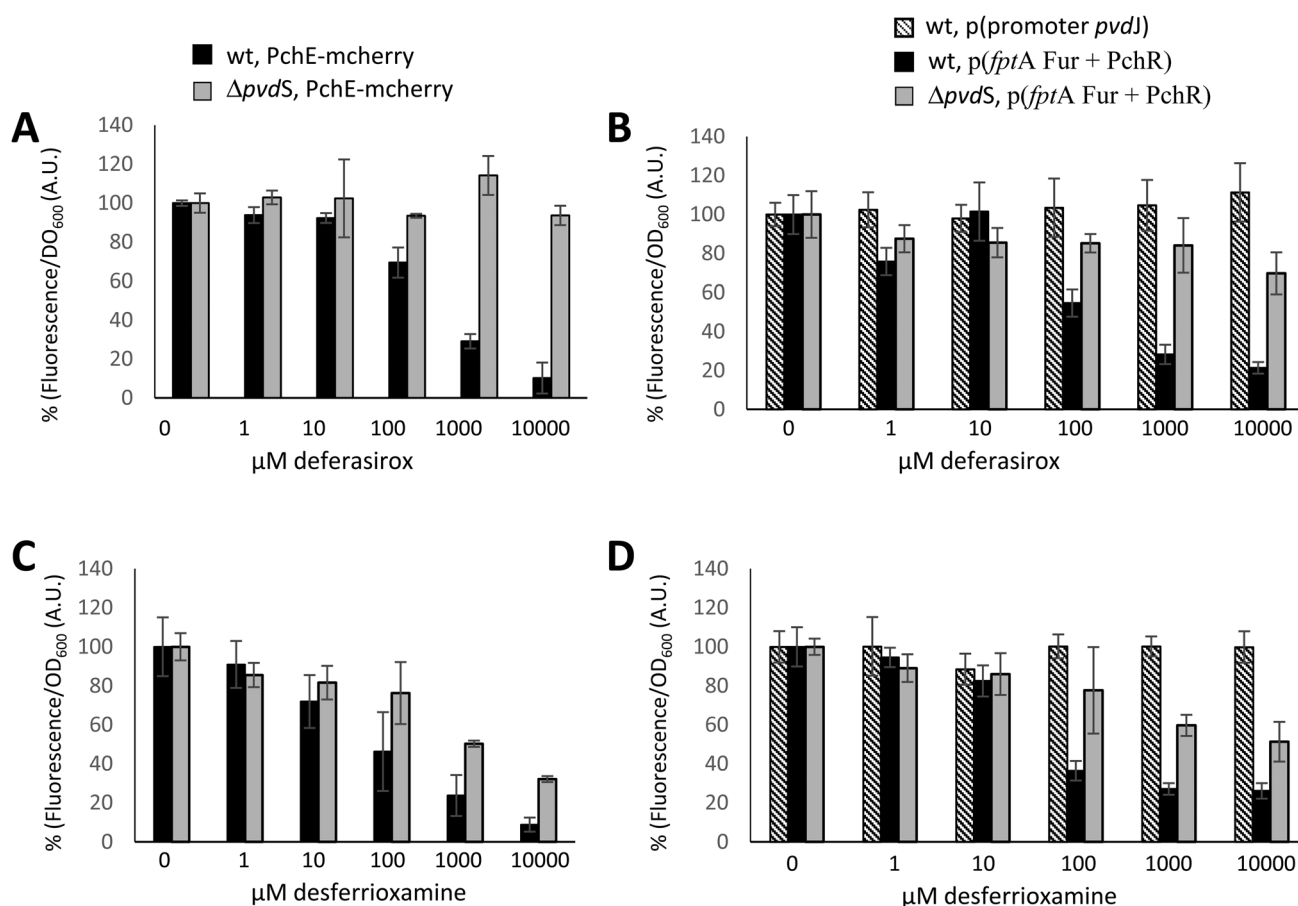


Fig. 5 Effect of iron chelators on PCH pathway expression. The mCherry ORF gene has been inserted into the chromosome of PAO1, at the 3' end of *pchE* (A and C), or into transcriptional reporter plasmids (p(*fptA*FurPchR) and p(*pvdF* promoter)) (B and D). mCherry fluorescence has been monitored after 20 h of growth, in the presence of different concentrations of deferasirox (A and B) or desferrioxamine (C and D), in the wt PAO1 (black) or $\Delta pvdS$ (grey) background. PchE-mCherry expression is followed at 610 nm (excitation at 570 nm). The results are normalized against the expression of mCherry/OD_{600 nm} in the absence of deferasirox, or desferrioxamine, and given in percent.

To validate the effect of these iron chelators on the expression of different genes from the PCH pathways, the transcriptional reporter plasmid containing the whole promoter of *fptA* (*p(fptAFurPchR)*, see above) fused to the ORF of *mcherry* was used, in wt PAO1 and $\Delta pvdS$ backgrounds. To check whether the effect on PCH production was a general effect due to iron depletion, another transcriptional plasmid was used. It contained the promoter region of *pvdF* (involved in the biosynthesis of PVD) fused to the ORF of *mcherry*, *p(pvdF promoter)*. The addition of any of the chelators did not affect the expression of mCherry in these control conditions (Fig. 5B and D). Next, the results obtained with the plasmid *p(fptAFurPchR)* confirmed those from the chromosomal fusion: the expression of mCherry decreased in the wt PAO1 background but not in the $\Delta pvdS$ background with deferiasirox (Fig. 5B) or more slightly with desferrioxamine (Fig. 5D). It was still possible that different PCH-Fe intake capacity could lead to this phenotype. To discard this possibility, we measured the expression of the reporter gene in deletion mutants of *fptA* (responsible for PCH-Fe intake), $\Delta fptA$, and $\Delta pvdS\Delta fptA$. If PCH-Fe intake was involved in the phenotype observed, then the deletion of *fptA*, and thus PCH-Fe intake, should lead to an almost identical expression of the PCH pathway whatever the environment. This was not what we observed (Fig. S4D, ESI†). In the double mutant $\Delta pvdS\Delta fptA$, there was a decrease of the reporter gene expression at higher competitor concentration. These results discard higher PCH-iron uptake from being responsible for increasing PCH production.

Thus, while the presence of competitors for iron chelation inhibits the expression of the PCH pathway in wt PAO1, *P. aeruginosa* may circumvent this inhibition in a $\Delta pvdS$ mutant. Altogether, when the bacteria face strong difficulties in iron import (either in a $\Delta pvdF\Delta pchA$ mutant or in a $\Delta pvdS$ mutant and in the simultaneous presence of iron chelators), they still manage to express their siderophore pathways even if their production involves auto-regulatory loops.

PCH production was inhibited in DMEM-serum medium in WT PAO1 but not in the $\Delta pvdS$ context

We then tested the effect of mammalian serum, which contains iron chelators like transferrin and contributes to deprive the infection sites of iron. Transferrin is a poorer iron chelator than PCH,⁴¹ which was confirmed by the CAS assay (Fig. S4C, ESI†). *P. aeruginosa* strains were grown in DMEM, a rich medium commonly used to grow mammalian cells, enriched with mammalian proteins (by bovine foetal serum supplementation), which comprise transferrin and/or other iron chelating molecules. Since mCherry measurement (as performed above) could be biased in DMEM medium due to phenol red, we only measured the production of PCH in this medium and compared it to the production in CAA. The production of PCH in DMEM-serum decreased drastically (Fig. 6), which may be due both to higher iron content, and, as described above, to the presence of transferrin that could outcompete PCH for iron binding. Nevertheless, the production of PCH increased strongly in the absence of PVD (Fig. 6). Thus, as with the

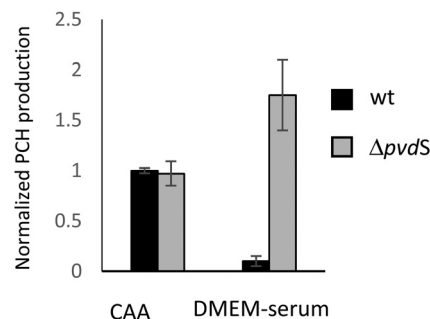


Fig. 6 Production of PCH after 8 h of growth in CAA and DMEM-serum by wt PAO1 and $\Delta pvdS$ strains. The results were normalized against the production of PCH by PAO1 grown in CAA. PCH concentration was monitored at 320 nm.

addition of desferrioxamine or deferiasirox, the PCH pathway was specifically restored/overexpressed even in the presence of human chelators, when *P. aeruginosa* was unable to produce PVD.

PVD and PCH did not compete for iron in CAA

The restoration of the PCH pathway expression in the $\Delta pvdS$ mutant in the presence of competitors (deferiasirox, desferrioxamine or serum) could be also due to the absence of PVD production. Since PVD has a higher affinity for iron than PCH,^{7,8} it is more efficient than PCH in scavenging iron when this metal becomes rare and should inhibit the induction of the PCH pathway. Nevertheless, we did not observe any competition between PVD and PCH, leading to a decrease of PCH production when wt PAO1 cells were grown in CAA. Indeed, we did not observe differences in PCH production in PAO1 versus $\Delta pvdS$ (Fig. S1, ESI†). Similarly, only a slight overexpression of the chromosomal fusion *pchE-mcherry* was observed in $\Delta pvdS$ mutant cells versus PAO1 (Fig. 7A). Thus, the pyoverdine that is produced all over the experiment does not inhibit the expression of the PCH pathway.

It is still possible that a competition may occur, but only if PVD is added at the beginning of the experiment. We checked this hypothesis by adding 20, 40, 60, and 120 μ M concentrations of purified PVD (that ranged from 1/5 to slightly more than one equivalent of PVD produced at the end of the culture) at the beginning of WT PAO1 and $\Delta pvdS$ mutant cultures, both strains carrying a chromosomal fusion *pchE-mcherry*. The expression of PchE-Mcherry was measured after 5 h, 10 h and 20 h of growth (Fig. 7B and C). In these conditions, as shown in the literature,^{42,43} we observed a decrease of the PCH pathway expression, which reflected a competition for iron between PVD and PCH. This decrease of the PCH pathway expression was quite similar in the wt PAO1 and $\Delta pvdS$ mutant. These results confirmed that the PVD produced by the wt PAO1 cells during the experiment did not induce an inhibition of the PCH pathway. Thus, PVD is able to inhibit PCH synthesis, but only if it is present from the beginning of the experiment.

The low level of PCH production in the presence of deferiasirox, desferrioxamine, or serum in the wt PAO1 strain is only due to the addition of the iron chelators at the beginning of the experiment and not due to a competition with PVD produced by

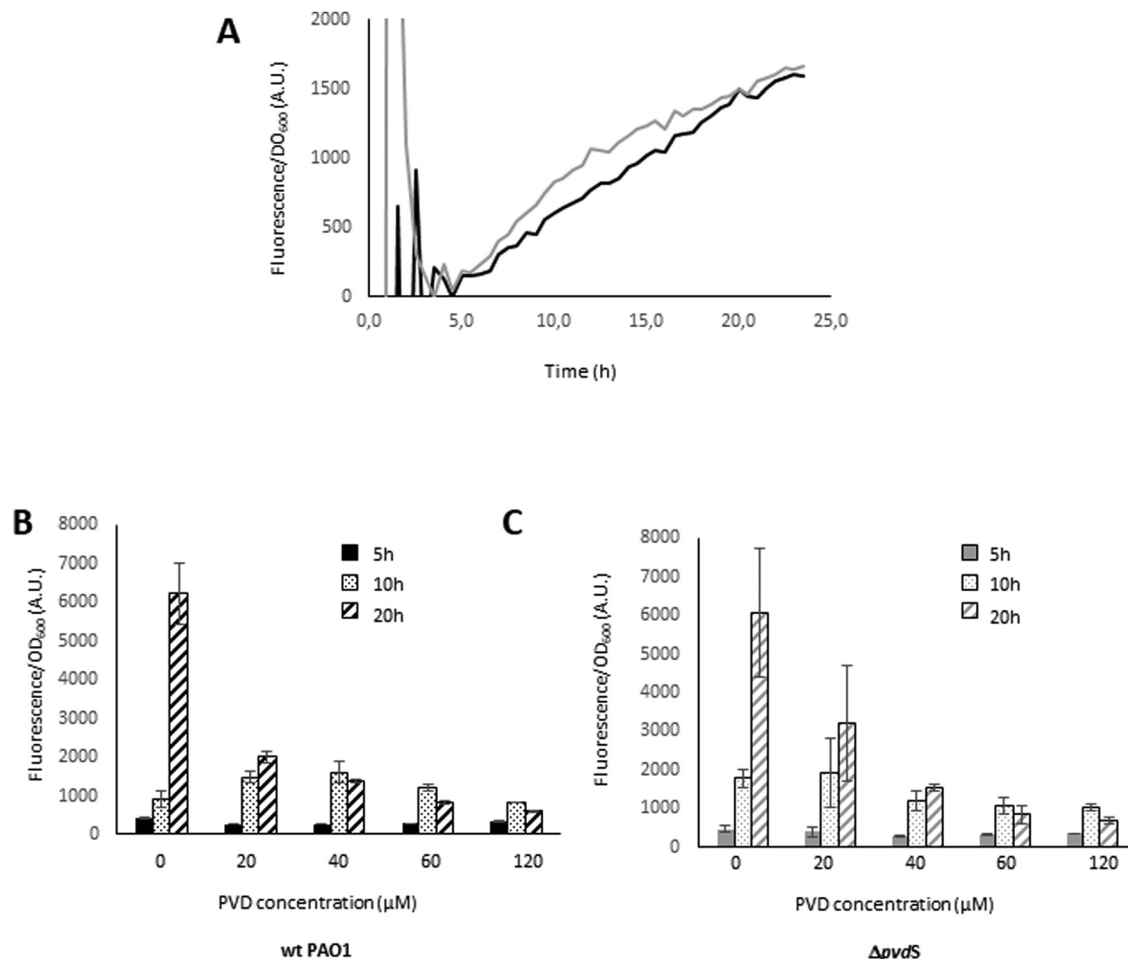


Fig. 7 Effect of the presence of PVD on the PCH pathway expression. (A) Monitoring of the expression of PchE-mCherry fluorescence in the wt PAO1 (black) or $\Delta pvdS$ context (grey) during 24 h of growth in CAA. (B and C) Monitoring of the expression of PchE-mCherry fluorescence after 5, 10 and 20 h of growth in CAA in the WT PAO1 (B) and $\Delta pvdS$ (C) backgrounds. Different amounts of PVD have been added at the beginning of the experiment to assess its effect on PchE-mCherry expression. PchE-mCherry expression is followed at 610 nm (excitation at 570 nm).

the cells. Consequently, the restoration of PCH production in the $\Delta pvdS$ strain is not due to a lack of competition with PVD.

Conclusions

Since iron is of utmost importance for life, bacteria have diversified their iron import strategies to adapt to ever changing environments. *P. aeruginosa* imports iron mainly through the production of two siderophores, PVD and PCH. In this bacterium, the production of both siderophores is associated with positive autoregulation loops, built from different modules/proteins. Nevertheless, the comparison between these two systems has only been marginally studied, mainly because of a lack of knowledge on the PCH system. We highlighted in this study a mechanism that could allow the bacteria to escape from the requirement of ferri-siderophore to switch on their respective pathway. Such an 'evasion' mechanism has already been described for the PVD pathway, and we showed that the PCH pathway can as well escape from PCH-Fe requirement.

The regulatory cascade leading to PCH production is based on PchR, a AraC type of transcription factor, which requires an

inducer. It was previously shown that PCH-Fe, not PCH alone, was the inducible co-factor. Nevertheless, the regulation of this system proved to be more complex. Under strong difficulties to get access to iron (for example when both siderophores are not produced anymore), the cell manages to overcome the requirement of PCH for its own synthesis, probably through a mechanism based on the dual regulation of the PCH effector expression by an inducer (PchR) and a repressor (Fur), as depicted Fig. S5 (ESI[†]). Along with other studies, our results highlighted the complexity of these intricate regulation mechanisms between the PVD and PCH pathways, and Fur regulation. Nevertheless, further studies would be required to characterize more deeply the relative contribution of PchR *versus* Fur, and the role of PVD production/absence in this balance. ChIP experiments on PchR and Fur flag-tagged proteins for example could help to unravel some of these questions. Another point that should be clarified is the fate of PCH-Fe once it enters the cell through FptX. Indeed, free PCH-Fe may trigger an oxidative stress (Adler *et al.*⁴⁴). How does PchR get access to this PCH-Fe, and may this unknown mechanism add a layer of regulation on PCH expression? May

this mechanism even modify the regulation balance between PchR and Fur? PVD production is already known to be regulated at the level of the membrane through Sigma/anti-Sigma factors, would it be the case for PCH? These subtle adaptations of siderophore production under varied stresses certainly deserve further investigation to fully appreciate iron uptake.

It further appears that the positive autoregulation of production of both siderophores takes similar routes to that of quorum sensing molecules. The comparison would be interesting to follow up, by considering siderophores as sensing molecules. Indeed, the iron content of the media is often a signal for lifestyle changes (at low iron content, the bacteria switch to biofilm for example). Further comparison between both systems – iron import and quorum sensing – should also improve our understanding of the other functions that may be fulfilled by these iron import systems.

These results may also help to reconsider the role and importance of PCH. *P. aeruginosa* is often responsible for chronic lung infection in patients suffering from cystic fibrosis. The sequence of different strains from chronically infected patients revealed that *P. aeruginosa* accumulated mutations in the promoter of some genes, like *pvdS*, leading to the absence of PVD production.³⁶ In such an environment, the bacteria may force the production of PCH, which pleads for a non-negligible role of PCH in infections. Such a conclusion is also attested by recent studies, in which the deletion of the PCH system affected the virulence of the bacteria in a mouse infection model,⁴⁵ or highlighted the role of PCH in oxidative stresses.⁴⁶ Thus, the tug of war for iron between host and bacteria seems to be ever more complex, with the bacteria optimizing all their iron import panoply to get access to iron.

Authors contribution

C. O. and G. G. performed most of the experiments, C. L. A. and F. A. designed and produced the plasmids used and transformed the different strains, G. V. purified pyoverdine, M. G. L. A. produced deferrioxamine, P. A. and M. S. I. designed and performed the EMSA, S. A. P. and B. D. designed and performed the proteomics analysis, S. I. J. and F. P. designed the experiments, and F. P. wrote the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was partly funded by the *Centre National de la Recherche Scientifique*. O. Cunrath held a fellowship from the French *Ministère de la Recherche et de la Technologie* (3 years) and the *Fondation pour la Recherche Médicale* (6 months). G. Graulier held a PhD fellowship from the French *Ministère de la Recherche et de la Technologie*, and A. Y. Carballido Lopez from the University of Strasbourg (IDEX). J. P. and I. M. S. thank the Laboratory of

Excellence GRAL (grant ANR-11-LABX-49-01) and the Labex ARCANÉ (grant ANR-11-LABX-0003-01).

References

- 1 M. Miethke and M. A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007, **71**, 413–451.
- 2 I. J. Schalk and O. Cunrath, *Environ. Microbiol.*, 2016, **18**, 3227–3246.
- 3 M. Nairz, S. Dichtl, A. Schroll, D. Haschka, P. Tymoszyk, I. Theurl and G. Weiss, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2018, **48**, 118–133.
- 4 R. Golonka, B. S. Yeoh and M. Vijay-Kumar, *J. Innate Immun.*, 2019, 1–14.
- 5 A. F. Konings, L. W. Martin, K. J. Sharples, L. F. Roddam, R. Latham, D. W. Reid and I. L. Lamont, *Infect. Immun.*, 2013, **81**, 2697–2704.
- 6 P. Cornelis and J. Dingemans, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2013, **3**, DOI: 10.3389/fcimb.2013.00075.
- 7 A.-M. Albrecht-Gary, S. Blanc, N. Rochel, A. Z. Ocaktan and M. A. Abdallah, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 6391–6402.
- 8 J. Brandel, N. Humbert, M. Elhabiri, I. J. Schalk, G. L. A. Mislin and A.-M. Albrecht-Gary, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2820–2834.
- 9 I. L. Lamont, A. F. Konings and D. W. Reid, *Biometals*, 2009, **22**, 53–60.
- 10 M. A. Llamas, F. Imperi, P. Visca and I. L. Lamont, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2014, **38**, 569–597.
- 11 I. L. Lamont, P. A. Beare, U. Ochsen, A. I. Vasil and M. L. Vasil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 7072–7077.
- 12 R. J. Edgar, G. E. Hampton, G. P. C. Garcia, M. J. Maher, M. A. Perugini, D. F. Ackerley and I. L. Lamont, *Mol. Microbiol.*, 2017, **106**, 891–904.
- 13 N. Folschweiller, I. J. Schalk, H. Celia, B. Kieffer, M. A. Abdallah and F. Pattus, *Mol. Membr. Biol.*, 2000, **17**, 123–133.
- 14 M. Shirley and I. L. Lamont, *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 5634–5640.
- 15 R. C. Draper, L. W. Martin, P. A. Beare and I. L. Lamont, *Mol. Microbiol.*, 2011, **82**, 1444–1453.
- 16 P. A. Beare, R. J. For, L. W. Martin and I. L. Lamont, *Mol. Microbiol.*, 2003, **47**, 195–207.
- 17 F. Tiburzi, F. Imperi and P. Visca, *Mol. Microbiol.*, 2008, **67**, 213–227.
- 18 R. J. Edgar, X. Xu, M. Shirley, A. F. Konings, L. W. Martin, D. F. Ackerley and I. L. Lamont, *BMC Microbiol.*, 2014, **14**, 287.
- 19 L. Michel, N. González, S. Jagdeep, T. Nguyen-Ngoc and C. Reimann, *Mol. Microbiol.*, 2005, **58**, 495–509.
- 20 D. Cobessi, H. Celia and F. Pattus, *J. Mol. Biol.*, 2005, **352**, 893–904.
- 21 O. Cunrath, V. Gasser, F. Hoegy, C. Reimann, L. Guillon and I. J. Schalk, *Environ. Microbiol.*, 2015, **17**, 171–185.
- 22 P.-C. Lin, Z. A. Youard and C. Reimann, *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, 2013, **26**, 1067–1073.

- 23 P. Visca and F. Imperi, *Future Microbiol.*, 2018, **13**, 853–856.
- 24 J. Pérard, J. Covès, M. Castellan, C. Solard, M. Savard, R. Miras, S. Galop, L. Signor, S. Crouzy, I. Michaud-Soret and E. de Rosny, *Biochemistry*, 2016, **55**, 1503–1515.
- 25 S. Nader, J. Pérard, P. Carpentier, L. Arnaud, S. Crouzy and I. Michaud-Soret, *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, 2019, **32**, 501–519.
- 26 U. A. Ochsner, A. I. Vasil and M. L. Vasil, *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 7194–7201.
- 27 P. Cornelis, S. Matthijs and L. V. Oeffelen, *Biometals*, 2009, **22**, 15–22.
- 28 U. A. Ochsner and M. L. Vasil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 4409–4414.
- 29 S. Steinhäuser, U. Heinz, M. Bartholomä, T. Weyhermüller, H. Nick and K. Hegetschweiler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, 4177–4192.
- 30 H. Gross and J. E. Loper, *Nat. Prod. Rep.*, 2009, **26**, 1408–1446.
- 31 V. Gasser, L. Guillon, O. Cunrath and I. J. Schalk, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **148**, 27–34.
- 32 F. Hoegy and I. J. Schalk, *Methods Mol. Biol.*, 2014, **1149**, 337–346.
- 33 V. Gasser, E. Baco, O. Cunrath, P. S. August, Q. Perraud, N. Zill, C. Schleberger, A. Schmidt, A. Paulen, D. Bumann, G. L. A. Mislin and I. J. Schalk, *Environ. Microbiol.*, 2016, **18**, 819–832.
- 34 O. Cunrath, V. A. Geoffroy and I. J. Schalk, *Environ. Microbiol.*, 2016, **18**, 3258–3267.
- 35 A. Carballido Lopez, O. Cunrath, A. Forster, J. Pérard, G. Graulier, R. Legendre, H. Varet, O. Sismeiro, Q. Perraud, B. Pesset, P. Saint Auguste, D. Bumann, G. L. A. Mislin, J. Y. Coppee, I. Michaud-Soret, P. Fechter and I. J. Schalk, *Metallomics*, 2019, **11**, 1937–1951.
- 36 C. Winstanley, S. O'Brien and M. A. Brockhurst, *Trends Microbiol.*, 2016, **24**, 327–337.
- 37 E. Banin, M. L. Vasil and E. P. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 11076–11081.
- 38 S. Moreau-Marquis, G. A. O'Toole and B. A. Stanton, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009, **41**, 305–313.
- 39 J. Galet, A. Deveau, L. Hôtel, P. Frey-Klett, P. Leblond and B. Aigle, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, **81**, 3132–3141.
- 40 S. Srifuengfung, S. Assanasen, M. Tuntawiroon and S. Meejanpetch, *Asian Biomed.*, 2010, **4**, 631–635.
- 41 S. Sriyosachati and C. D. Cox, *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 885–891.
- 42 Z. Dumas and R. Kümmerli, *J. Evol. Biol.*, 2012, **25**, 473–484.
- 43 A. Ross-Gillespie, Z. Dumas and R. Kümmerli, *J. Evol. Biol.*, 2015, **28**, 29–39.
- 44 C. Adler, N. S. Corbalán, M. R. Seyedsayamdost, M. F. Pomares, R. E. de Cristóbal, J. Clardy, R. Kolter and P. A. Vincent, *PLoS One*, 2012, **7**, e46754.
- 45 F. Minandri, F. Imperi, E. Frangipani, C. Bonchi, D. Visaggio, M. Facchini, P. Pasquali, A. Bragonzi and P. Visca, *Infect. Immun.*, 2016, **84**, 2324–2335.
- 46 M. Pasqua, D. Visaggio, A. L. Sciuto, S. Genah, E. Banin, P. Visca and F. Imperi, *J. Bacteriol.*, 2017, **199**, e00472.

Chapitre II

Construction de mutants de

P. aeruginosa exprimant

constitutivement un marqueur

fluorescent inséré dans le chromosome

1. Résumé de l'article

Pour étudier les interactions de Pa nous avons été confrontés au problème de la différenciation des souches durant les expérimentations. Les méthodes déjà existantes sont assez contraignantes dues à l'utilisation de milieux différentiels (mais qui ne permettent pas de suivre toutes les bactéries) ou utilisant des marqueurs nécessitant l'utilisation d'ATB. L'utilisation d'ATB n'est pas toujours pratique car elle entraîne des changements physiologiques qui vont fausser le fitness et les interactions observées et leur utilisation n'est pas possible lorsqu'on s'intéresse justement à l'étude de conditions contenant des ATB. C'est pourquoi nous avons tenté de développer un nouvel outil de suivi de Pa en co-cultures.

Nous voulions donc développer un outil nous permettant de détecter Pa sans avoir recours à l'utilisation d'ATB et même de plasmide. Pour cela, nous avons intégré le gène codant pour le rapporteur fluorescent mCherry dans le chromosome en ciblant une région intergénique pour ne perturber l'expression d'aucun autre gène. Cette région a déjà été caractérisée et utilisée avec un insert basé sur l'utilisation d'un transposon designé par Choi et Schweizer (Choi and Schweizer, 2006). Nous avons donc ciblé cette région située entre les gènes *glmS* et PA5548. Brièvement, nous avons construit un insert comportant la région codante de mCherry devancé par un promoteur constitutif de façon à avoir une expression basale et donc une certaine corrélation entre l'expression du marqueur et le nombre de cellules. Nous avons entouré cette séquence par des 'spacers' pour éviter tout effet polaire sur l'expression des gènes environnants. L'insertion a été réalisée par double recombinaison homologue.

Une fois les mutants construits nous avons vérifié la possible corrélation entre la fluorescence et la quantité de cellules par mesure de la DO_{600} . Nous avons également testé l'utilisation de ce mutant pour des expériences de co-cultures et ce aussi bien inter qu'intra-espèces.

Nous avons réussi à obtenir un mutant de PAO1 exprimant de façon constitutive le tag mCherry. Cependant nous n'avons pas réussi à établir un lien de corrélation entre le niveau de fluorescence et la DO_{600} , du moins durant la phase exponentielle. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en conditions de stress (carence en fer, compétition, ...) même l'expression des gènes de ménages peut être affectée. Dans notre méthode il est donc nécessaire d'avoir recours au dénombrement bactérien pour le suivi de la croissance mais ce dernier peut se faire sans avoir à utiliser de milieu spécifique, les colonies du mutant marqué pouvant être discriminées grâce à leur fluorescence.

Ce mutant a ensuite été testé en co-culture avec une souche PAO1 $\Delta pvdS$ de façon à mimer une compétition intra-espèce comme on peut en retrouver dans les poumons, mais également avec deux bactéries d'autres genres bactériens (*Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*) qui peuvent également être retrouvés lors d'infections chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Il a été possible de suivre la croissance des différentes souches en co-culture grâce à cette souche marquée de façon fiable en utilisant la méthode de dénombrement. Ces tests nous ont également permis d'observer des résultats intéressants. Nous avons pu observer que Pa PAO1 Wild-Type (WT) prend le dessus lors des compétitions inter-espèces, mais pas intra-espèces mais que dans tous les cas la production de PVD est différente en fonction des conditions. Pa semble adapter sa production de PVD en fonction du niveau de compétition pour le fer.

Nous avons donc mis au point un outil de biologie moléculaire permettant l'insertion d'un marqueur fluorescent (ici mCherry) dans le chromosome de Pa exprimé constitutivement et permettant la discrimination de Pa au sein d'un mélange bactérien. Cet outil se révèle fiable d'après nos études et peut être modifié pour l'insertion d'une autre protéine, au choix de l'utilisateur. Cela permet notamment de compléter une souche avec un gène dont l'expression est physiologique (présence d'une seule copie), sans générer d'effets polaires importants et sans marqueur supplémentaire. Pour ce projet de thèse nous avons utilisé cet outil pour insérer le marqueur mCherry aux isolats cliniques de la lignée B de Pa que nous avons utilisés pour les études de co-cultures avec des bactéries compétitrices (chapitre IV). Cet outil servira également à confirmer les tendances observées pour la compétition intra-espèce observées en présence d'ATB dans le chapitre V.

2. Résultats détaillés présentés sous forme d'un article en préparation pour soumission

Importance and fine tuning of pyoverdine production in intra versus inter specific competition

Forster Anne^{1, 2}, Graulier Gwenaëlle^{1, 2}, Cramer Nina³, Schalk Isabelle^{1, 2}, and Fechter Pierre^{1, 2*}

¹Université de Strasbourg, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France

²CNRS, UMR7242, ESBS, Bld Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France

³ address

* to whom correspondence should be addressed : p.fechter@unistra.fr

Background

Pseudomonas aeruginosa (PA) is a common cause of hospital-acquired infections including respiratory-associated pneumonias, bacteremias, urinary tract and surgical site infections, and is particularly feared by cystic-fibrosis (CF) patients^{1 2}. In chronic infection, like CF, PA may settle in the lung where it evolves to adapt even more to the local environment, and/or to drug curation³. This adaptation influences its interaction with the other bacteria from the microbiota⁴, the composition of the microbiota itself, and its response to antibiotic cure⁵. In addition of this genomic stable evolution, the bacteria can directly adapt some traits, or phenotypes, such as the secretion of toxins, the scavenging of nutrients, to biotic or abiotic changes in the environment^{6 7} ... Because the expression of an 'adaptative phenotype' is costly, it may solely be expressed when required, and adjusted to match the level of local changes⁸. Such studies have been increasing since several years, but are still facing the lack of tool to specifically follow the growth of PA (especially when grown in the presence of other bacteria) and the expression of specific factors in such conditions. These studies are dependent on either a vector that carries the gene of a fluorescent (or any other) reporter, but that has the inconveniency to add an antibiotic resistance gene, that modifies the membrane structure and hinders any studies on the influence of antibiotics on such bacterial interaction, on the use of specific PA plates, but that still present some inconsistencies, or on HTS⁹, more complex to settle and more expensive. Recently, a Tn7-based vectors have been developed to this end¹⁰. This vector integrates in the chromosome, downstream of the highly conserved *glmS* gene, and the selection markers may subsequently be excised from the bacterial chromosome with yeast Flp recombinase through a second cloning/mating step. This method still requires two steps (recombination then excision) and may not avoid polar effect especially in *P. aeruginosa*, where both flanking genes (*glmS* and PA5548) are close to the cloning site. We improve this method, to gain time and lower the polar effects.

We applied this method to incorporate genes in different isolates of PA, even one resistant to different antibiotics, and monitored the adaptation of the production of pyoverdine (PVD), a PA specific siderophore, to different bacterial competitors^{11 12}.

Iron is of utmost importance for most living organisms, and due to its poor bioavailability, a battle for its supply is engaged in the microbiota, and at the interface with the host^{13 14 15}. For bacteria, one of the more commonly used strategies to acquire iron involves the synthesis of siderophores and their release into the environment in order to chelate iron^{16,17 18}.

Siderophores chelate iron in the extracellular environment, and the resulting ferri-siderophore complex is then actively transported back into the cell^{19 17}. During a chronic infection, PA faces two types of bacterial competition, either from bacteria from other *phylae* (termed inter-specific competitor), or from isogenic strains that evolved in the host environment (termed intra-specific competitor). Previous researches showed that siderophores play a crucial role in these two types of battle for iron. For inter-specific competition, the secretion of efficient and specific siderophores seems to represent an efficient way to outcompete the other bacteria in the race for iron^{20 21}. Intra-specific competition applies for example when the secreted siderophores can be shared between cells that possess a compatible receptor for uptake, one producing the siderophore the other not, but still capitalizing on the siderophores produced by the other^{22 23 24}. Such non producer strains are called ‘cheater’ as they can benefit from the resources of others without having to pay the metabolic price of pyoverdine synthesis^{25 26}. In the lung environment of CF patients often arose variants with mutations in the *pvdS* gene^{27 25} the principal transcription factor of the PVD pathway.

We applied our cloning method to get insight into these different roles of the PVD pathway.

We grew PA with an isogenic PA $\Delta pvdS$ variant, leading to non-PVD producers, but which can still import it if produced by other variants. We further grew PA with *Klebsiella pneumoniae* (KP) or *Acinetobacter baumannii* (AB), two other pathogens from the lung, for

inter-specific competition and quantified the variation in PA's PVD production. We finally monitored the effect of the loss of *pvdS* on the competition between PA and the other species.

Method

Bacteria and media

The PA and *Escherichia coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. *E. coli* strains were routinely grown in LB (BD-Difco) at 37°C. strains were first grown overnight at 37°C in LB broth and were then washed, re-suspended and cultured at 37°C in appropriate medium: LB or MHII-chelex + 1% FBS (Gibco Fetal Bovine Serum Ref A3160801). MHII chelex was obtained by the addition of a chelating agent (chelex 100 sodium form, Ref C790, Sigma-Aldrich) to MHII (Mueller Hinton BD), according to the manufacturer's recommendation. When required, gentamycin (30 µg.ml⁻¹) were added to PA cultures. The cells are then pelleted by centrifugation and re-suspended in fresh medium, and the resulting suspension was diluted to the OD_{600nm} required. KP and AB are from the collection of the Strasbourg University Hospital.

Vector construction

All enzymes for DNA manipulation were purchased from Fermentas and were used in accordance with the manufacturer's instructions. *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen) was used as the host strain for all plasmids. The DNA fragments used for cloning were amplified with Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). The primers used are listed in Table S2. To insert the spacers fragments, the In-Fusion method (Gibco) has been used, following the manufacturer's recommendations.

The DNA fragment corresponding to the constitutive promoter of the gentamicin-3-acetyltransferase (antibiotic resistance gene) was amplified from the pEXG2 vector, the DNA fragment corresponding to the promoter *araC* was amplified from the pBAD24 vector, the terminator was amplified from the pUC18T-mini-Tn7T-gfpmut3, and the two spacer sequences used to frame the insert were amplified from pUCP18 and pMMB190 vector. The mcherry

sequence was amplified from the pcDNA3 mcherry vector. Finally, the DNA fragment used to amplify the flanking region (glmS, PA5548 gene) was from PAO1 ATCC15692.

All these fragments were inserted at appropriate place in the vector pEXG2.

Selection of mutants

Mutations in the chromosomal genome of PA were generated by transferring the pEXG2 suicide vector from *E. coli* SM10 strains into the PAO1 strains and allowing the plasmid to integrate into the chromosome, with selection for gentamycin resistance. Insertion mutants were selected by streaking the gentamicin resistant clones on no-salt LB agar containing 6% (w/v) sucrose. The sucrose-resistant clones were verified by PCR and the presence of the insert was confirmed by sequencing.

Bacterial growth monitoring

To confirm the production of Mcherry in the different strains, and different media, the cells were cultured overnight in LB medium, pelleted by centrifugation, re-suspended in the appropriate medium, and the resulting suspension was diluted to obtain an OD_{600nm} of 0.01 units. 200 µl of the suspension per well were dispensed into a 96-well plate (Greiner, U- bottomed microplate). The plate was incubated at 30°C, with shaking, in a Tecan microplate reader (Infinite M200, Tecan) for measurements of OD_{600nm} and mCherry (excitation/emission wavelengths: 570 nm/610 nm) fluorescence at 30 min intervals, for 24h.

For all other experiments, the cells were cultured overnight in LB medium, pelleted by centrifugation, re-suspended in the appropriate medium, and the resulting suspension was diluted to obtain an OD_{600nm} of 0.01 units (LB or MHII-chelex + 1%FBS). 10 ml of this suspension were cultured at 37°C in falcons.

For the following sections, each experiments have been reproduced three times

qRT-PCR

Specific gene expression was measured by RT-qPCR, as previously described. RNAs were purified from culture in falcons (described above) as described previously. We then reverse transcribed 1 µg of total RNA with a High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The amounts of specific complementary DNAs were assessed in a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems) with Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the appropriate primers (Table S2). The transcript levels for a given gene in a given strain were normalized with respect to those for *uvrD* and are expressed as a ratio (fold change) relative to the reference conditions.

Enumeration

After each hour of culture in falcons, 100 µl was taken and serially diluted in LB. 50µl, 100µl or 200µl of the dilution 10^4 , 10^5 , 10^6 , or 10^7 were plated on LB-agar. Mcherry-producing strains were visualized thanks to a Typhoon with filter Cy3 excitation/emission 550-570

Pyoverdine production measurement

After each hour of culture in falcons, 200 µl was taken to measure the OD_{400nm} in a Tecan microplate reader (Infinite M200, Tecan), as well as pyoverdine fluorescence (excitation/emission 400-447nm)

CAS assays

Chrome Azurol S (CAS) assay was used to assess the production of strong iron chelators by the different strains, adapted from Schwyn and Neilands²⁸. CAS (Sigma-Aldrich) was prepared as described and 4.4 mg of sulfosalicylic acid was added to 5 mL of CAS to accelerate chemical reactions. 100 µL of this solution are dispensed into 96-well plate and 100 µL of serial dilution of culture supernatants added. The plate was incubated 24 hours in the dark and OD₆₃₀ are taken. The blue CAS-iron solution turned pink in the presence of stronger iron chelator than CAS.

Results

Construction of the insert

We choosed to insert our vector in the PA intergenic region between the *glmS* and PA5548 genes. Indeed, this site is already used to insert the 4500 bp of the pUC18T mini-Tn7T-Gm vector, derived from the Tn7 transposon, and is well conserved across PA isolates.

The vector is described in Figure 1. Different fragments were sequentially inserted into pEXG2 vector. First, 700 bp of the flanking region corresponding to *glmS*, to which a *SpeI* restriction site was added, were inserted into *HindIII/XbaI* sites of the pEXG2 vector. 700 bp of the flanking region corresponding to PA5548, with addition of *EcoRI* and *NcoI* restriction sites were inserted between the *XhoI/KpnI* sites. The promoter region (the constitutive Pc promoter from pEXG2 vector or alternatively the inducible AraC promoter from pBAD) was then inserted between the *SpeI* and *XhoI* sites, and then the *rrnB* terminator from the plasmid pUC18T-mini-Tn7T-Gm was added between the *NcoI* and *EcoRI* sites. Two spacers sequences of 500 bp, *i.e.* two non coding sequences from pUCP18 and pMMB190 vectors, were further added into the *SpeI* sites and *NcoI* sites to limit any polar effect (*In Fusion*, Gibson). Finally, mcherry ORF was added to the pEXG2-spacer-Pc construction with the aim to add a fluorescent marker to different PAO1 isolates, and specifically follow them in co-culture with other bacteria.

Construction of P. aeruginosa isolates insertion mutants

Insertion of the mcherry ORF between the *glmS* and PA5548 genes of PA was achieved by transferring the allelic exchange vectors from the *E. coli* strain (SM10) into the PA strains by biparental mating, with selection for gentamicin resistance. Insertion mutants were selected by streaking the gentamicin resistant clones on no-salt LB agar containing 6% (w/v) sucrose. The

sucrose-resistant clones were verified by PCR and sequencing. This method enable to incorporate the mcherry gene with the constitutive Pc. We confirmed that this method could be used to incorporate constructions into different PA backgrounds (test on PA ATCC15692, different longitudinal isolates from a single patients B5, B19, B25, or other isolates (E1). Fluorescent clones could even be detected by scanning with a Typhoon with filter Cy3 excitation/emission 550-570, so that we have been able to clone our construction into a Gm resistant isolates (B25, MIC_{gentamycin} ~ 100 µg/ml).

In a first trial, we cloned the mcherry gene in a construction lacking the two spacer regions. With this construction, we observed strong polar effect when the bacteria was grown in LB or in MHII-chelex supplemented with FBS. By qRT-PCR, we observed that, if the *glmS* gene was weakly overexpressed (< 2.5 fold), the PA5548 gene was heavily overexpressed (>20 fold). The insertion of the spacer regions at both end of the construction enable to drastically limit the polar effect (< 2.5 fold) in either media (Figure 2).

We then followed the growth of the strains, as well as the production of pyoverdine, in different constructions to insure that the insertion of DNA fragments at this site would not affect other traits of the bacteria, that will be studied in the following section. No insertion did affect either the growth or the production of PVD (Figure 2).

Enumeration to estimate the proportion of P. aeruginosa in co-culture with different competitors

We then cultivated PA-spacer-Pc-Mcherry with different bacterial competitors, pathogens of the lung: KP and AB. KP produced different siderophore, among them aerobactin and yersinabactin, while AB produced acinetobactin, baumannoferrins, and fimsbactins. To study the adaptation of PVD production to the presence of competitors, we cultivated the bacteria in an iron-limited media (MHII-chelex) in which FBS (1%) was added. FBS contains iron, but

chelated by eukaryotic molecules like ferritin, heme, ...and thus adding FBS mimicks the biodisponibility of iron in a host environment. For that, we cultivated the bacteria in falcons, and at each hour, we plated an aliquot of the culture, and measured the OD_{600nm} as well as the Mcherry fluorescence. The fluorescence of the PA-spacer-Pc-Mcherry allowed us to distinguish, on plates, this strain from any of the competitors (Figure 3A). The first objective was to find a correlation between Mcherry production and PA growth (from OD_{600 nm}), to ease the studies on co-cultivated bacteria. By measuring the OD_{600nm} and the Mcherry fluorescence, we correlate both measure (PA-spacer-Pc-Mcherry OD_{600nm} and Mcherry fluorescence, to be able to deduce in further co-culture experiments the proportion of PA. To ensure that it could be feasible, we first verified that Mcherry production per bacteria was similar when PA-spacer-Pc-Mcherry was cultivated in mono or in co-culture. We calculated at different time of growth, the ratio Mcherry fluorescence / CFU_{PAO1} (from plating) when PAO1-spacer-Pc-Mcherry was grown in mono-culture, as well as in co-culture with KP, AB, and the isogenic PA Δ pvdS strain at different growth time. If the ratio was pretty similar in the lag phase whatever the culture/co-culture tested, it differed during the exponential phase, with almost 2-fold difference in some instances (Figure 3B). Such adaptation of gene expression, even concerning house keeping gene, to external stresses has already been observed. It meant that Mcherry production varied depending on the stress imposed (here, presence of competing bacteria). As a consequence, it would not be accurate to extract from the OD_{600nm} the proportion of PAO1 through the measurement of Mcherry fluorescence. We thus had to rely on enumeration to differentiate the bacteria grown in co-culture.

Up-regulation of pyoverdine production when P. aeruginosa engaged competition

Before any competition experiments, we compared the strength of the iron chelators produced by these bacteria, through a CAS assay. This assay is based on a competition for iron between

chrome azurol S and the supernatant of the tested bacteria. We applied this test to monitor the strength of iron chelation by the supernatants of cultures of the different bacteria grown in MHII-chelex (PA, KP, AB). PA supernatant chelated iron more efficiently than the two other bacteria, as well as the isogenic $\Delta pvdS$ mutant (Figure 4), reflecting a higher iron scavenging potential. While the supernatant of $\Delta pvdS$ and AB shared similar iron chelation strength, the supernatant of KP was not able to compete with chrome azurol S for iron chelation.

We then co-cultivated PAO1-spacer-Pc-Mcherry with either KP or AB to follow inter-specific competition or with an isogenic mutant that did not produce pyoverdine ($\Delta pvdS$), to follow intra-specific competition. In the conditions tested, *i.e.* in a medium where iron is limiting, and mainly available as chelates with host molecules, and where the competitors are inoculated 1 :1 all strains grew less efficiently in co-culture than in monoculture, especially during the exponential phase of growth¹². PA took further progressively the lead over the competitive strains (KP and AB) except for intraspecific competition ($\Delta pvdS$). In all competition also, PA increases its PVD production during the exponential phase. This increase in PVD production is further fine-tuned to fit the level of competition: PA sense not only the presence of a competitor, but the level of competition. Interestingly, this increase in PVD production was more important in intra-specific competition than in inter-specific competition, as if the level of ‘competition’ was stronger with a cheater competitor.

Effect of the pyoverdine pathway on competitor growth

To appreciate the role of the PVD pathway in the interaction with extra-specific competitor, we then performed co-culture between the isogenic variant PA $\Delta pvdS$ and the two inter-specific competitors, KP, and AB. In the case of AB, the PVD pathway plays a crucial role in the competition, as its absence allow the growth of AB, even if with a slightly reduced fitness.

The PA variant itself grew slightly less efficiently. The interaction between PA and KP, on the opposite, is almost not affected by the inhibition of the PVD pathway, KP grew weakly in the presence of the $\Delta pvdS$, as it is the case for a wt PA.

Discussion

The new vector enabled to easily transform different isolates from PA, leading to a constitutive production of Mcherry, and eased the following of its growth during co-culture experiments. It should nevertheless be mentioned that enumeration was required to accurately estimate the ratio of PA in co-culture. This vector may be used to induce the production of any protein, under any promoter, as a single copy in a chromosomal region without extensive side polar effects.

This construction allowed us to detail the role of the PVD pathway - often affected in isolates from chronically infected CF patients - in some examples of competition between PA and either an isogenic variant, $\Delta pvdS$, in which the principal transcription factor of the PVD pathway has been deleted, or between two inter-specific competitor bacteria that may also infect the lung, KP and AB. By using a PA mutant in which the gene *pvdA* was deleted, a gene only involved in the biosynthesis of PVD, we observed the same trend than with the $\Delta pvdS$ mutant, *i.e.* similar results after 24h of growth. These results showed that even if *pvdS* may secondary regulate other paths than PVD biosynthesis^{29 30}, that could have affected its interactions with the competitors, the effects observed in our conditions were mainly carried by PVD.

For intra-specific competition (between isogenic variants), PVD is considered as a public good, that can benefit to both strains. The cheater avoids the metabolic cost of PVD production, but retain its capacity to use PVD produced by the cooperator strain. The latter has thus to compensate for the deficit in soluble iron created by the cheat consumption by upregulating PVD production²³. This was what we observed: the increase of PVD production by the wt PA was even more important than when it grew in presence of KP and AB. PVD has in that case a benefic role for the growth of the cheater. As a consequence, the growth of

wt PA was slower, due to the higher cost of PVD synthesis, while the growth of the cheater was increased due to available ferric-PVD. All along the 24h growth course, none lead to the disappearance of the other, the cheater taking even slightly the lead over the wt PA. One could then question about the reason of maintenance throughout evolution of such mutualism between microorganisms, with cooperative individuals being exploited by selfish cheaters ²² ²⁵. For a better understanding, it will be necessary to take into account the general evolution of the strain, not only focused on the PVD pathway, as these variants appear in a background of general adaptation to a complex environment ^{31 32 33}.

On the other hand, for inter-specific competition, the role of PVD is to scavenge iron for the own benefit of the producer, while restricting the access of the other bacteria to iron. The better is the chelator, the better is the competitor. PA can be considered as an efficient iron scavenger, as shown by the CAS assay, that may confer a fitness advantage in competition with other bacteria, despite the cost of PVD synthesis. This was confirmed by the growth experiments between PA-spacer-Pc-Mcherry and AB, in which PA-spacer-Pc-Mcherry took the lead and almost abolished the growth of the other strain. The inhibition of the PVD pathway in the $\Delta pvdS$ mutant decreased the capacity of PA to compete with the other bacteria: even after 24h, both strains were still present, with a slight reduced fitness as compared to monoculture. This agreed with the CAS assays, both strain's supernatant being similarly able to chelate iron $\Delta pvdS$. The interaction with KP, on the other hand, does not only rely on the PVD pathway, as KP grew faintly either with a wt PA or with a $\Delta pvdS$ variant. In the CAS assays, the $\Delta pvdS$ variant supernatant was still chelating iron more efficiently than that of KP, probably due to the second siderophore pyochelin, produced by PA. Altogether, siderophores are important factors in establishing interactions between bacteria, and the iron chelating potential of each is crucial to the fate of the interaction.

Thus, siderophores are important agent for intra and inter-specific competition, but their roles diverge: while they have a role of growth promoting public goods which can be cooperatively shared between intra-specific competitors, it has an important role to lead the competition for inter-specific competition. In the lung, there are both type of competitions: the presence of a PVD producer could thus favour the growth of isogenic cheaters while preventing the growth of inter-specific competitors. The presence of cheaters, on the other hand, could favor a higher diversity in the microbiota. The loss of metabolic fitness in PA could indeed ease the growth of bacteria from other phylae, and also favour a higher intra-diversity⁹, that may be crucial to the adaptation of the strain to the local environments.

Modeling intra-competition through isogenic variants is nevertheless a simplified vision of such competition in microbiota. Indeed, bacterial genome sequencing has shown that most bacteria can produce siderophores and have genes that encode transporters involved in the import of ferri-siderophore complexes, either specific to their own siderophore, or involved in the uptake of exo-siderophore: bacteria have thus the ability to hijack siderophores produced by other bacteria, and even iron chelated by host factors^{34 35 36 37}. In that sense, siderophores may present properties of intra or inter-specific competitors against any bacteria, that add another layer of complexity to their role in the battle for iron ; they could play a predatory role in the competition between some bacteria, but also in some instances be involved in synergisms, that are another crucial trait of bacterial interactions. Considering all these traits, the use by the bacteria of their different iron uptake pathways has to be finely regulated to make the most of the local environment, while avoiding the toxic effect of higher iron loads, that will depend on the availability of iron, on the nature, the strength, the amount and kinetic of production of the different iron chelators from the organisms present in the microbiota^{12 38 18}, the growth parameters^{12 24}, and even on cell-to-cell contact³⁹. Further, all these local phenotypic adaptations will also have consequences on the virulence of the bacteria, through

cross-talk between regulation pathways^{30 40}. Different transcription factors sensitive to iron concentration (going from global regulatory factors like Fur to specific regulators dedicated to siderophore production like PvdS) may thus connect iron availability to virulence traits. Far more studies will thus be required to fully schematize the battle for iron in a microbiota.

Conclusion

Due to both the diversity of bacterial species and the abundance of the community present in microbiota, competition between species for space and nutrients is established through physical and chemical interactions. These interactions can be mutualistic or synergistic, and siderophores take an important part in their establishment. Nevertheless, despite an increasing interest in characterizing the interactions between species, the phenotypic plasticity linked to the expression of iron-uptake pathways in complex environments and more generally the molecular mechanisms underlining these bacterial interactions, the potential implications of these interactions in the progression of polymicrobial infections are still poorly understood. Such studies have to be enlarged to many different interaction examples, that still appeal for improved methodologies to follow these complex bacterial mixtures.

References

1. Giske, C. G., Monnet, D. L., Cars, O., Carmeli, Y., & ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 813–821 (2008).
2. Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).
3. Rossi, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 331–342 (2021).
4. Eberl, L. & Tümmler, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **294**, 123–131 (2004).
5. Clark, S. T., Guttman, D. S. & Hwang, D. M. Diversification of *Pseudomonas aeruginosa* within the cystic fibrosis lung and its effects on antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, (2018).
6. Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H. & Nomura, N. Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. *Microbes Environ.* **28**, 13–24 (2013).
7. Oliveira, N. M. *et al.* Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biol.* **13**, e1002191 (2015).
8. Cornforth, D. M. & Foster, K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 285–293 (2013).
9. Cramer, N., Fischer, S., Hedtfeld, S., Dorda, M. & Tümmler, B. Intracolon competitive fitness of longitudinal cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates in liquid cultures. *Environ. Microbiol.* **22**, 2536–2549 (2020).

10. Choi, K.-H. *et al.* A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**, 443–448 (2005).
11. Tyrrell, J. & Callaghan, M. Iron acquisition in the cystic fibrosis lung and potential for novel therapeutic strategies. *Microbiology* **162**, 191–205 (2016).
12. Leinweber, A., Weigert, M. & Kümmerli, R. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* senses and gradually responds to interspecific competition for iron. *Evolution* **72**, 1515–1528 (2018).
13. Konings, A. F. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Uses Multiple Pathways To Acquire Iron during Chronic Infection in Cystic Fibrosis Lungs. *Infect. Immun.* **81**, 2697–2704 (2013).
14. Golonka, R., Yeoh, B. S. & Vijay-Kumar, M. The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J. Innate Immun.* 1–14 (2019) doi:10.1159/000494627.
15. Nairz, M. *et al.* Iron and innate antimicrobial immunity—Depriving the pathogen, defending the host. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **48**, 118–133 (2018).
16. Miethke, M. & Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **71**, 413–451 (2007).
17. Schalk, I. J. & Cunrath, O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* n/a-n/a (2016) doi:10.1111/1462-2920.13525.
18. Cornelis, P. & Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, (2013).
19. Cornelis, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1637–1645 (2010).

20. Schiessl, K. T., Janssen, E. M.-L., Kraemer, S. M., McNeill, K. & Ackermann, M. Magnitude and Mechanism of Siderophore-Mediated Competition at Low Iron Solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin System. *Front. Microbiol.* **8**, 1964 (2017).
21. Filkins, L. M. *et al.* Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J. Bacteriol.* **197**, 2252–2264 (2015).
22. West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A. & Diggle, S. P. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 597–607 (2006).
23. Ross-Gillespie, A., Dumas, Z. & Kümmerli, R. Evolutionary dynamics of interlinked public goods traits: an experimental study of siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Evol. Biol.* **28**, 29–39 (2015).
24. Scholz, R. L. & Greenberg, E. P. Sociality in *Escherichia coli*: Enterochelin Is a Private Good at Low Cell Density and Can Be Shared at High Cell Density. *J. Bacteriol.* **197**, 2122–2128 (2015).
25. Griffin, A. S., West, S. A. & Buckling, A. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* **430**, 1024–1027 (2004).
26. Jiricny, N. *et al.* Fitness correlates with the extent of cheating in a bacterium. *J. Evol. Biol.* **23**, 738–747 (2010).
27. De Vos, D. *et al.* Study of pyoverdine type and production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations. *Arch. Microbiol.* **175**, 384–388 (2001).
28. Schwyn, B. & Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56 (1987).
29. Cornelis, P. The ‘core’ and ‘accessory’ regulons of *Pseudomonas*-specific extracytoplasmic sigma factors. *Mol. Microbiol.* **68**, 810–812 (2008).

30. Llamas, M. A., Imperi, F., Visca, P. & Lamont, I. L. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 569–597 (2014).
31. Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 39 (2017).
32. Winstanley, C., O'Brien, S. & Brockhurst, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol.* **24**, 327–337 (2016).
33. Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S. & Johansen, H. K. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **47**, 57–64 (2015).
34. Gasser, V. *et al.* Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunity for siderophore-antibiotic conjugates development. *Environ. Microbiol.* **18**, 819–832 (2016).
35. Perraud, Q. *et al.* Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* (2020) doi:10.1111/1462-2920.15372.
36. Perraud, Q. *et al.* Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms *. *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 589–607 (2020).
37. Normant, V. *et al.* Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem. Biol.* **15**, 2741–2751 (2020).

38. Reinhart, A. A. & Oglesby-Sherrouse, A. G. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes* **7**, 126 (2016).
39. Lin, J. *et al.* A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat. Commun.* **8**, 14888 (2017).
40. Kang, D. & Kirienko, N. V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Seoul Korea* **56**, 449–457 (2018).
41. Cunrath, O. *et al.* A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **17**, 171–185 (2015).
42. Guillon, L., Altenburger, S., Graumann, P. L. & Schalk, I. J. Deciphering protein dynamics of the siderophore pyoverdine pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* **8**, e79111 (2013).

Figure legends

Figure 1. Scheme of the pEXG2 vector with the construct allowing the cloning of genes between the *glmS* and PA5548 genes of *P. aeruginosa* strains. In bold are the two restriction sites in which the construct has been inserted. The different fragments inserted are colored, and the different restriction sites that can be used to clone other genes / promoters / terminators are noted.

Figure 2. Polar effect due to the insertion of DNA fragments between *glmS* and PA5548.

(A) Analysis of changes in transcription of *glmS* and PA5548 genes due to the insertion of constructs with/without spacer regions, depending on the medium used. (B) Measurement of growth and PVD production in LB after 10h and 20h of culture. Growth of the strains was followed at 600 nm (left), and the production of PVD was monitored at 400 nm, then normalized to the growth (OD_{600nm}). (C) The same parameters were followed when bacteria were grown in MH-chelex-FBS.

Figure 3. Mcherry production as a function of competition. The strain PA-spacer-Pc-Mcherry was grown in MH-chelex-FBS and in the presence/absence of bacterial competitors. The production of Mcherry was followed at 610 nm (excitation at 570 nm), and normalized to the enumeration of *P. aeruginosa* at different time of growth.

Figure 4. Growth competition between PA and intra/extra competitors. (A) The iron chelation capacity of the tested strains was measured through a CAS assay. The strain PA-spacer-Pc-Mcherry (PA); *K. pneumonia* (KP), *A. Baumannii* (AB), PA Δ pvdS (Δ pvdS) have

been grown in MH-chelex-FBS for 16 hours before measuring the capacity of their supernatant to hijack iron from CAS as described in Material and Methods. PVD at ... μM has been used as a reference. **(B)**, **(C)**, **(D)** Growth of the different strains cultivated alone or in mixed culture in MH-chelex-FBS. Growth was given in CFU/ml at different time, after enumeration of the colonies from plated culture aliquots. Filled forms are for the strains cultivated alone, and opened forms when cultivated in mixed culture. In that case, imaging the plates enabled to distinguished PA from the other strain of the mixed culture. The strain in bold is further the one enumerated. **(E)** As PVD is fluorescent, its production can be followed at 450nm (excitation 400 nm) at different time of growth. PVD production has been normalized to the enumeration of PA in the different conditions tested.

Figure 5. Growth competition between $\text{PA}\Delta\text{pvdS}$ and competitors. The strain $\text{PA}\Delta\text{pvdS}$ (ΔpvdS) was cultivated alone or in the presence of *K. pneumonia* (KP) or *A. baumannii* (AB) in MH-chelex-FBS. Growth was given in CFU/ml at different time, after enumeration of the colonies from plated culture aliquots. The strain in bold is the one enumerated.

Table S1. Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Collection ID	Relevant characteristic	references
Strains			
<i>E.coli</i> Top10		F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ	Invitrogen
PAO1 ATCC15692	Wild-type		
PAO1 ATCC15692-mcherry	PAS	PAO1 with chromosomally insertion of Pc prom + mCherry through pAF43	This Study
PAO1 ATCC15692-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 with chromosomally insertion of Pc prom + mCherry through pAF43	This Study
PAO1 ATCC15692-AraC prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 with chromosomally insertion of AraC prom + mCherry through pAF44	This Study
PAO1 ATCC15692-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 with chromosomally insertion of spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48	This Study
PAO1 B5			
PAO1 B5-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 B5 with chromosomally insertion of spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48	This Study
PAO1 B19			
PAO1 B19-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 B19 with chromosomally insertion of spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48	This Study
PAO1 B25			
PAO1 B25-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 B25 with chromosomally insertion of spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48	This Study
PAO1 E1			
PAO1 E1-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 E1 with chromosomally insertion of spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48	This Study
Δ pvdS	PAS386	PAO1; <i>pvdS</i> chromosomally deleted	
Δ pvdS-spacer-Pc prom_mCherry	PAS à définir après la mise en collection	PAO1 Δ pvdS with chromosomally insertion of	

spacer sequence + Pc prom + mCherry through pAF48
--

plasmids

<i>Expression plasmids</i>					
pEXG2			allelic exchange vector with pBR origin, gentamicin resistance, sacB		
pEXG2- intergenic region-Pc prom		pAF41	pEXG2 carrying the sequence to insert Pc promoter + terminator in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region -araC prom		pAF42	pEXG2 carrying the sequence to insert araC promoter + terminator in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region-Pc prom-mCherry		pAF43	pEXG2 carrying the sequence to insert Pc promoter + mCherry + terminator in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region-AraC prom-mCherry		pAF44	pEXG2 carrying the sequence to insert AraC promoter + mCherry + terminator in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region-spacer-Pc prom		pAF46	pEXG2 carrying the sequence to insert spacer sequence + Pc promoter + terminator + spacer sequence in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region-spacer-AraC prom		pAF47	pEXG2 carrying the sequence to insert spacer sequence + AraC promoter + terminator + spacer sequence in the intergenic region between glmS-PA5548		This study
pEXG2- intergenic region-spacer-Pc prom-mCherry		pAF48	pEXG2 carrying the sequence to insert spacer sequence + Pc promoter + mCherry + terminator + spacer sequence in the intergenic region between glmS-PA5548		This study

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides	Sequences 5'-3'	Used for the following construct
Cloning		
glmS For_HindIII	ATGCTAAAGCTTGATCTGCAACGTTGCCACCAG	For cloning glmS and inergenic region into pEXG2
glmS Rev_XbaI_SpeI	ATGCTATCTAGACTGCTCACTAGTCGGCTTCTCGGGCACGC	For cloning glmS and inergenic region into pEXG2
PA5548 For_XhoI_EcoRI_NcoI	ATGCTACTCGAGCTGCTCGAATTCCTGCTCCCATGGGGGCAG GCATGCGGC	For cloning PA5548 and inergenic region into pEXG2
PA5548 Rev_KpnI	ATGCTAGGTACCTCTCGGACTTCTTCGGCTGG	For cloning PA5548 and inergenic region into pEXG2
prom pEX SpeI For2	ATGCTAACTAGTATCGATGCATAATGTGCCTGTCAA	For cloning constitutive Pc promoter into pEXG2
prom pEX XhoI Rev2	ATGCTACTCGAGCCCGGGGATCCTCTAGACAT CGTTGCTGCTCCATAACATCAAAC	For cloning constitutive Pc promoter into pEXG2
prom araC SpeI for 2	ATGCTAA CTAGT ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAA	For cloning inducible AraC promoter into pEXG2
prom araC XhoI rev 2	AGGCTACTCGAGCCCGGGGATCCTCTAGACATGGAAATCAC CTTGCTGTTAGCCCAAAAAAACGGGTATGGAG	For cloning inducible AraC promoter into pEXG2
Term Tn7 EcoRI for	ATGCTAG AATTC TCGTCCGGGCCGCAAGCTC	For cloning the rrnB terminator into pEXG2
Term Tn7 NcoI rev2	ATGCTA CCATGG ACTGCGATGAGTGGCAGGGC	For cloning the rrnB terminator into pEXG2
mCherry Ser XbaI for	ATGCTAT CTAGA AGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGG	For cloning mCherry int pEXG2

mCherry EcoRI rev	ATGCTAGAATTC TTA CT TGTACAGCTCGTCCATGCC	For cloning mCherry into pEXG2
pUCP18 For Phus	CGAGAAGCCGACTAGCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTG A	For cloning the spacer sequences from pUCP18 into pEXG2
pUCP18 Rev Phus	GCGTAATAAGACTAGTTACGTGGCCTGTAGACG	For cloning the spacer sequences from pUCP18 into pEXG2
pMMB190 For Phus	TCATCGCAGTCCATGGCTCGGGTCGGTGGCTCTG	For cloning the spacer sequences from pMMB190 into pEXG2
pMMB190 Rev Phus	ATGCCTGCCCCATGCGGGCTTTGCCCGCCTTTC	For cloning the spacer sequences from pMMB190 into pEXG2
<i>qRT-PCR</i>	<i>Sequence</i>	<i>Gene</i>
uvrD F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA	uvrD
uvrD R	GCGGCTGACGGTATTGGA	uvrD
glmS for qRT	GGGCATGCCGCACATC	glmS
glmS rev qRT	ACATGGTACGAGAGCAATTGCA	glmS
PA5548 For qRT	ATTTCCCCGCCTTCACAGA	PA5548
PA5548 Rev qRT	GGTCACGCCGACGAAGAATA	PA5548

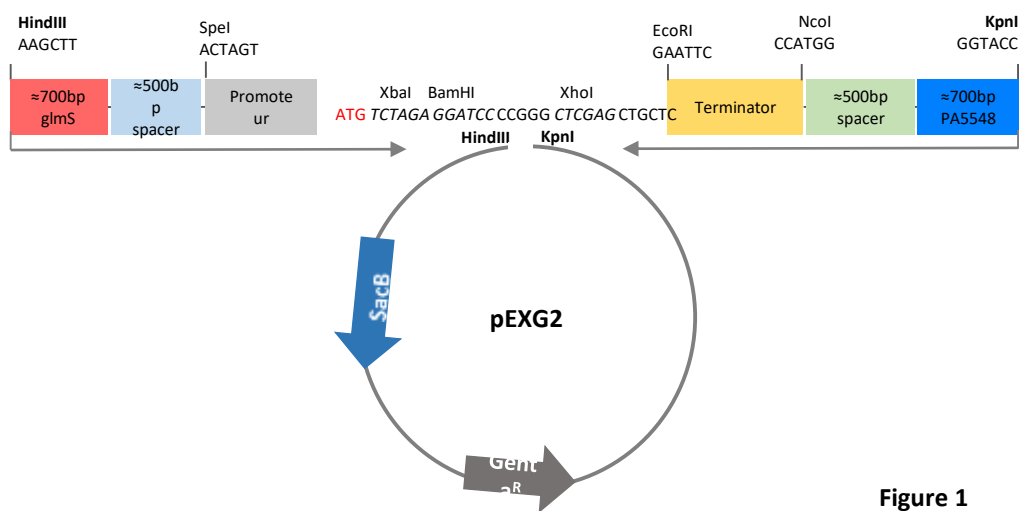
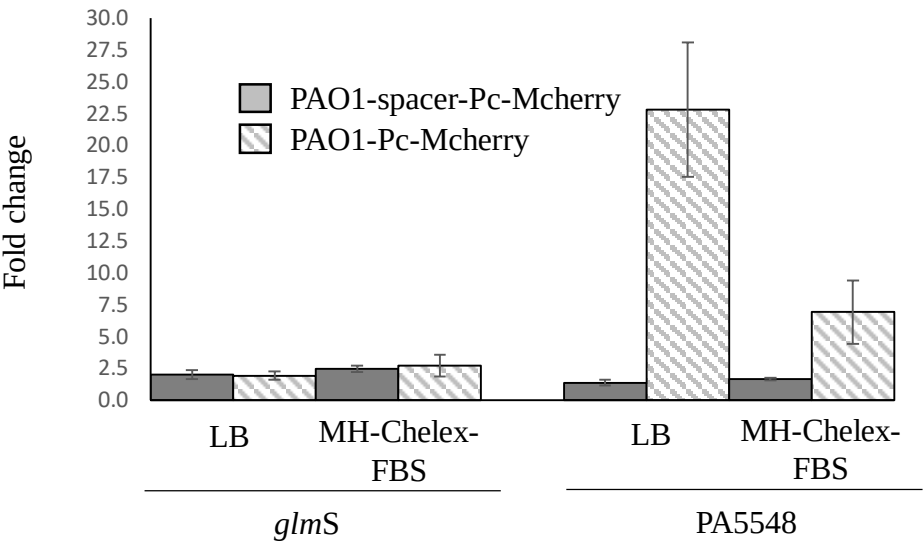
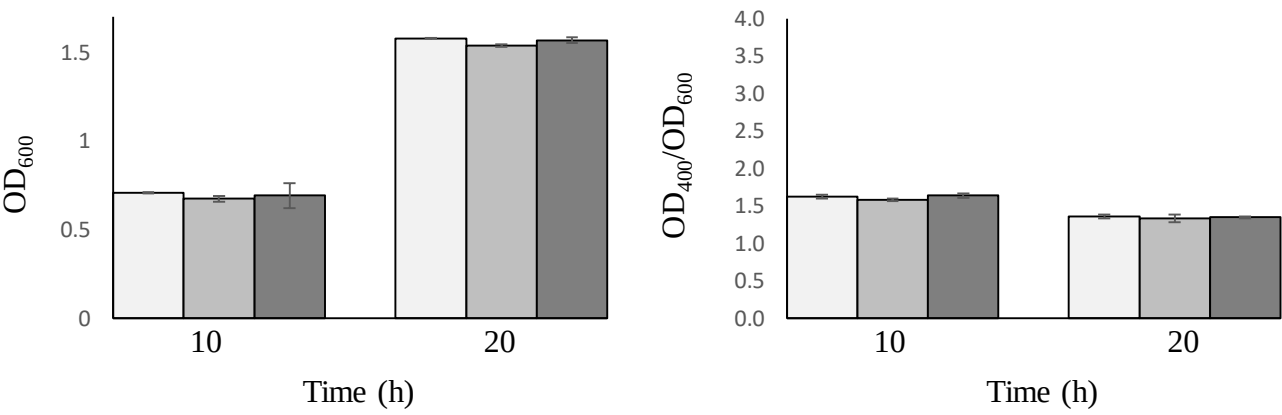


Figure 1

A



B



C

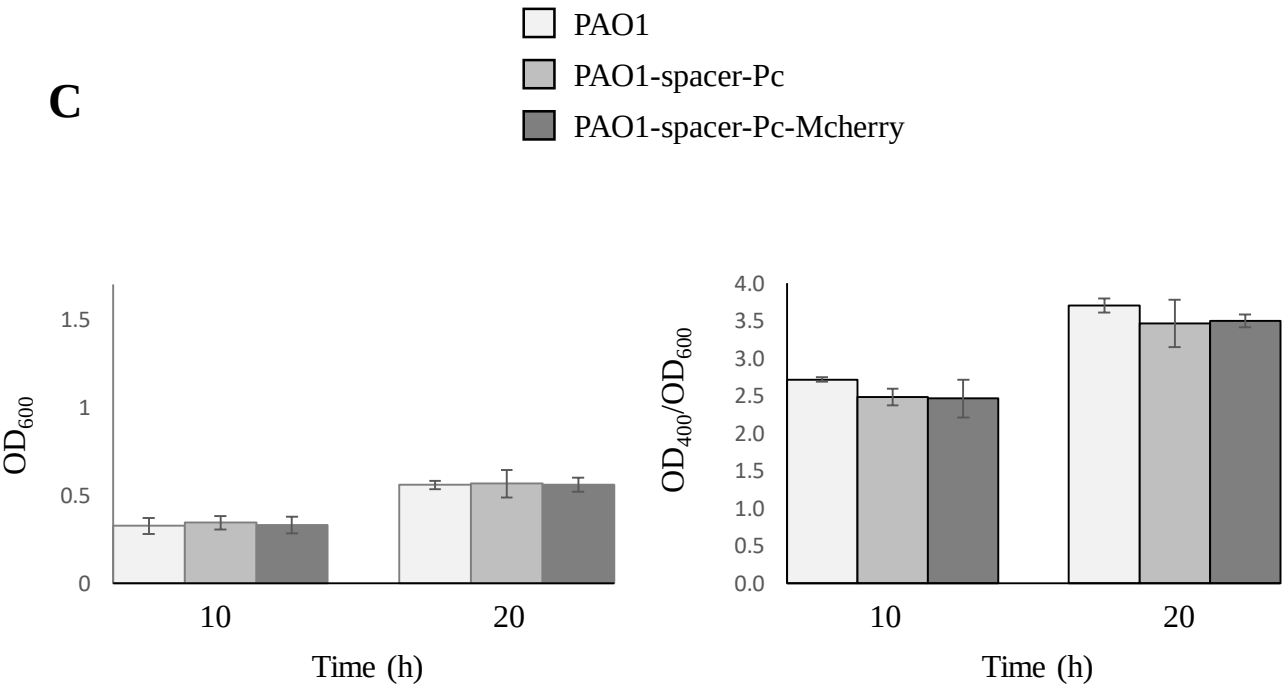


Figure 2

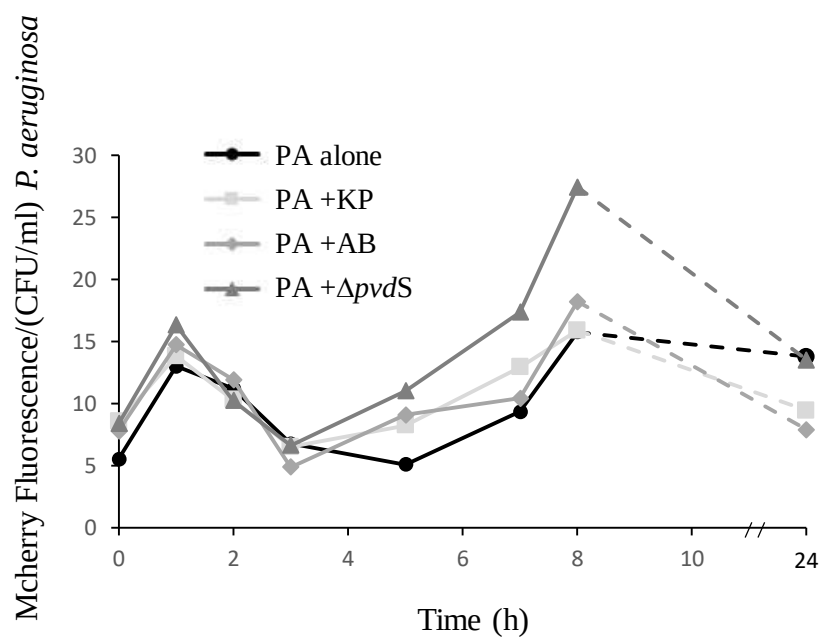
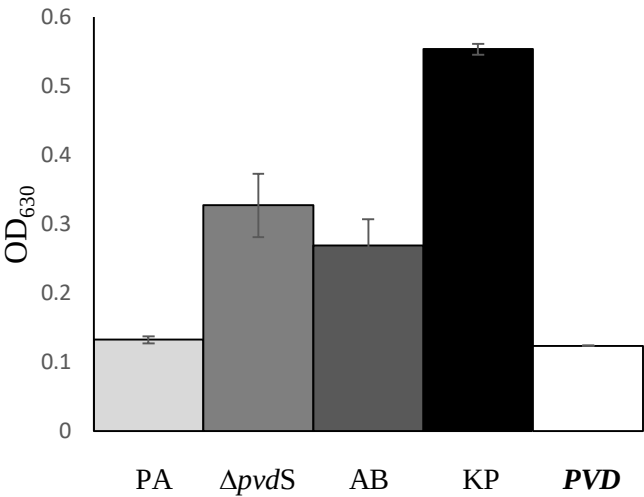
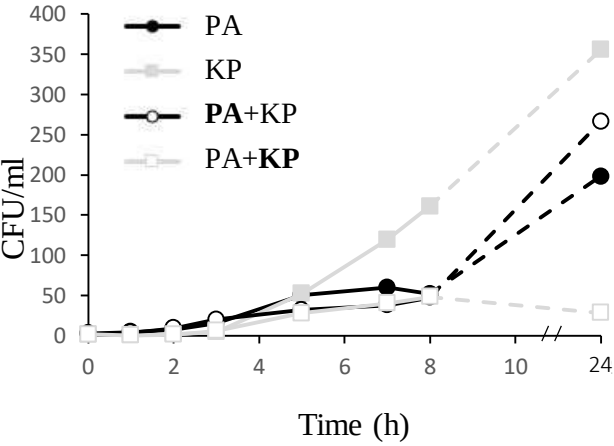


Figure 3

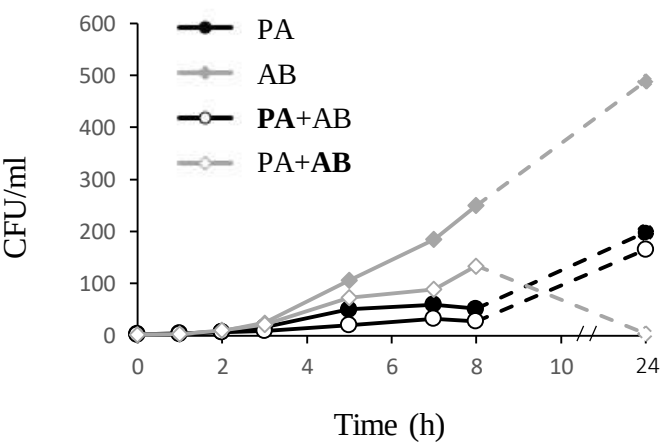
A



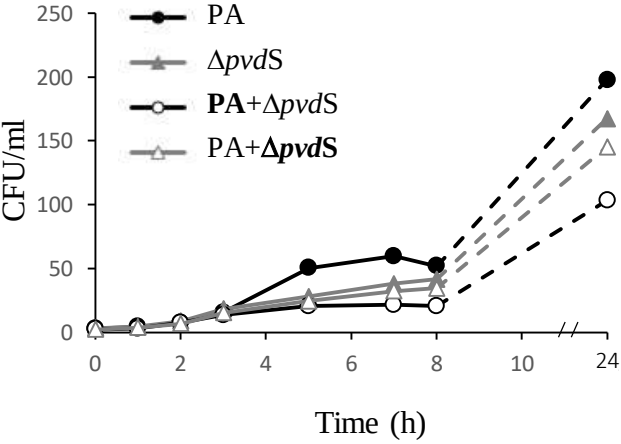
B



C



D



E

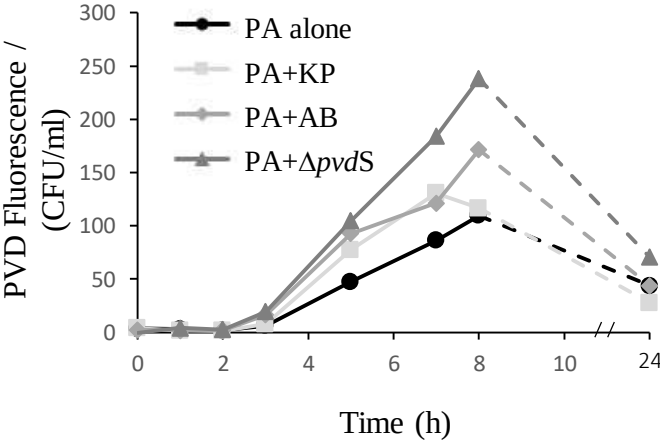
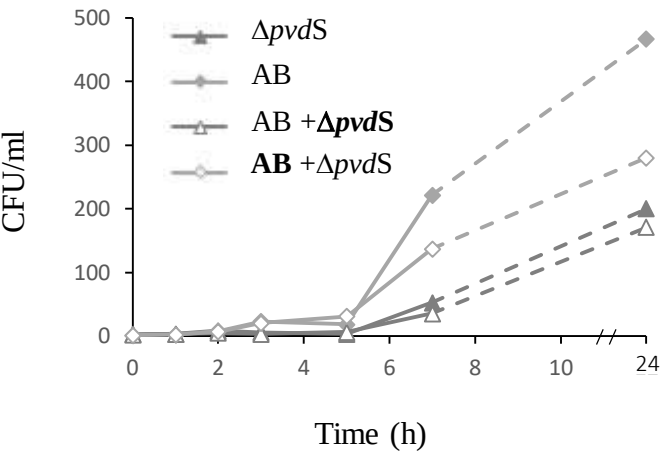


Figure 4

A



B

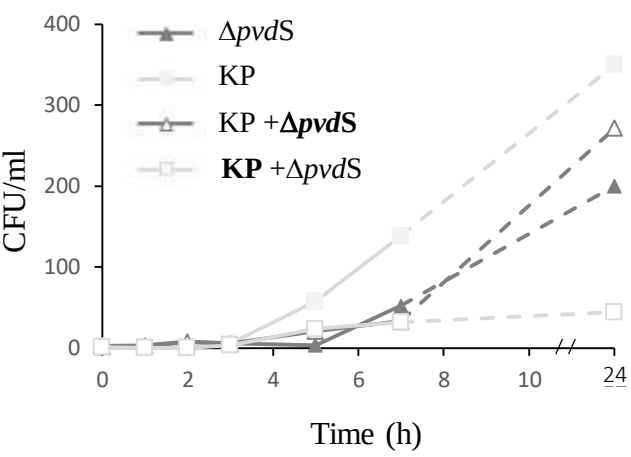


Figure 5

Chapitre III

Caractérisation physiologique d'une collection d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* et de bactéries compétitrices

1. Introduction

Les méthodes étant en place pour étudier les interactions entre bactéries, nous avons cherché à mieux caractériser le rôle des deux sidérophores de Pa dans ces interactions et l'importance de l'évolution de leur production. Nous nous sommes basés pour cela sur des isolats cliniques, autant pour Pa que pour les bactéries compétitrices. Si leurs génomes sont moins bien caractérisés et l'étude moléculaire plus délicate qu'avec des souches telle que Pa PAO1, les connaissances obtenues ces dernières années au laboratoire et ailleurs nous ont permis d'entamer ces études sur des souches isolées de patients.

Pour cela, nous avons contacté le laboratoire de Burkhard Tümmler (MHH, Hanovre), qui possède une collection d'isolats longitudinaux de Pa (>30 lignées). A travers une collaboration, nous avons eu accès à 5 lignées (B, E, F, G et K), dont nous avons étudié différents isolats présentant une évolution de la production de PVD. Parallèlement, nous avons eu accès à des souches de bactéries non Pa (dites compétitrices), issues de patients CF (collaboration Anne Doléans-Jordheim, CIRI, Lyon) et qui nous ont servies dans nos expériences d'interactions. Avant de commencer à explorer plus en détails les interactions des isolats cliniques de Pa avec les autres bactéries pathogènes, nous avons voulu caractériser avec plus de précision la physiologie des isolats de cette collection. Pour cela nous avons cherché à regarder différents paramètres tels que la croissance, la production de sidérophores, la formation de biofilms, ...

2. Caractérisation de la collection d'isolats cliniques de *P. aeruginosa*

2.1. Etablissement de courbes de croissance

Nous avons commencé par déterminer les courbes de croissances de nos différents isolats de Pa (Figure 29). Dans toutes les lignées, sauf la K, nous observons des différences de croissance entre les isolats. Si pour les lignées B et F (Figure 29 A et C) ce sont les isolats les plus avancés dans l'infection qui se développent le moins bien, cela n'est pas visible pour les autres lignées.

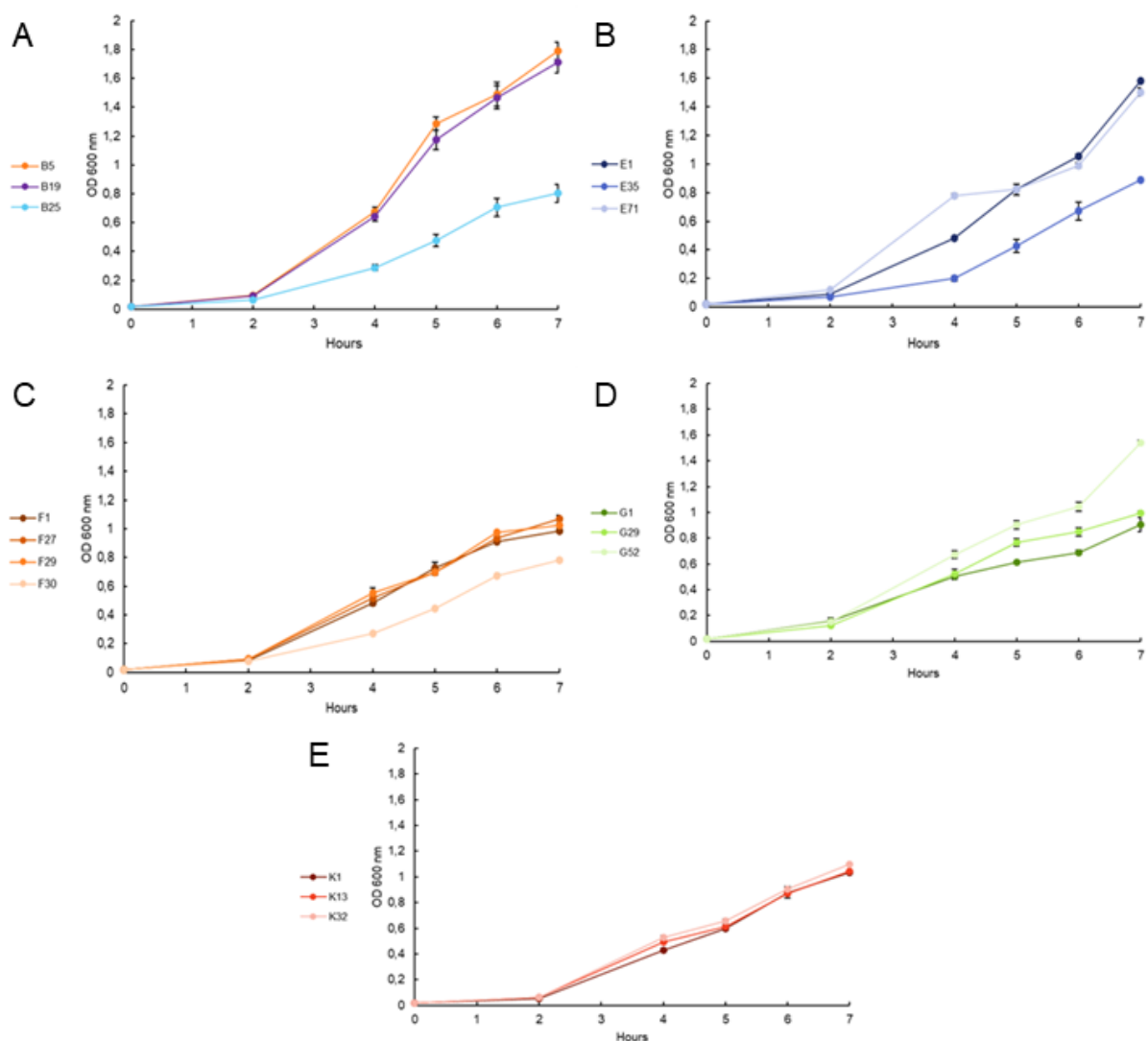


Figure 29 : Suivi de croissance des isolats des différentes lignées cliniques de *Pa* en milieu chelex + 1 % sérum par mesure de la DO_{600} . A : lignée B ; B : lignée E ; C : lignée F ; D : lignée G ; E : lignée K. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=2 sauf pour la lignée B n = 3).

2.2. Production de sidérophores

En parallèle de la croissance nous avons également déterminé la production de sidérophores. En milieu très carencé en fer (Figure 30 A) la différence flagrante de production de PVD est même visible à l'œil nu , certains ne produisant plus de PVD. Nous avons tout de même confirmé cela par dosage de la PVD (Figure 30 B). Certains isolats, comme l'isolat B25 produisent moins de 10 $\mu\text{mol/mL}$ au bout de 7 h de culture, ce qui est très peu, comparé à d'autres isolats tels

que B5 et B19 qui en produisent environ 65 $\mu\text{mol/mL}$. Nous pouvons ainsi prétendre que les isolats B25, E71, F30 et G29 ne produisent plus ou très peu de PVD.

Nous avons également pu voir des différences au niveau de la production de PCH (Figure 30 C). Encore une fois, certains isolats ne produisent plus de PCH, comme les isolats B25, F30 ou encore G29.

Ces résultats sur la production des sidérophores laissent voir que ces derniers sont bien impactés par l'évolution durant l'infection chronique. Il est souvent décrit que les voies des sidérophores ont tendance à voir leur expression diminuée, voire totalement inactivée (Winstanley *et al.*, 2016) et c'est bien le phénomène que nous pouvons observer avec les lignées B, E et F. Cependant, parmi les autres lignées de notre collection, le phénomène d'évolution de la production de sidérophores au cours de l'infection chronique ne suivait pas toujours ce schéma. Dans tous les cas la production de sidérophores, aussi bien PVD que PCH, est impactée par l'évolution au cours de l'infection et donc soumise aux adaptations environnementales de *Pa*. Ces résultats nous ont également permis de mettre en évidence que durant l'infection la production de PCH est elle aussi modifiée et que cette dernière joue surement un rôle plus important qu'il n'y paraît dans l'acquisition du fer en conditions d'infection. En revanche, les lignées G et K ont des comportements très différents. Pour la lignée G l'isolat intermédiaire G29 ne produit plus de PVD (mais cela ne semble pas corrélé à une diminution de sa croissance) puis l'isolat tardif G52 produit quant à lui plus de PVD que l'isolat initial G1. Le résultat est un peu similaire avec la lignée K où l'isolat tardif K32 produit plus de PVD. Cela peut s'expliquer par des mutations entraînant une surproduction de la PVD ou encore par un prélèvement effectué durant une reprise d'infection aiguë et donc un clone plus virulent. Il semble également qu'une augmentation de la production de PCH ne soit pas forcément liée à une diminution de la PVD et donc une compensation, ni qu'il n'y ait de lien avec de possibles difficultés de croissance.

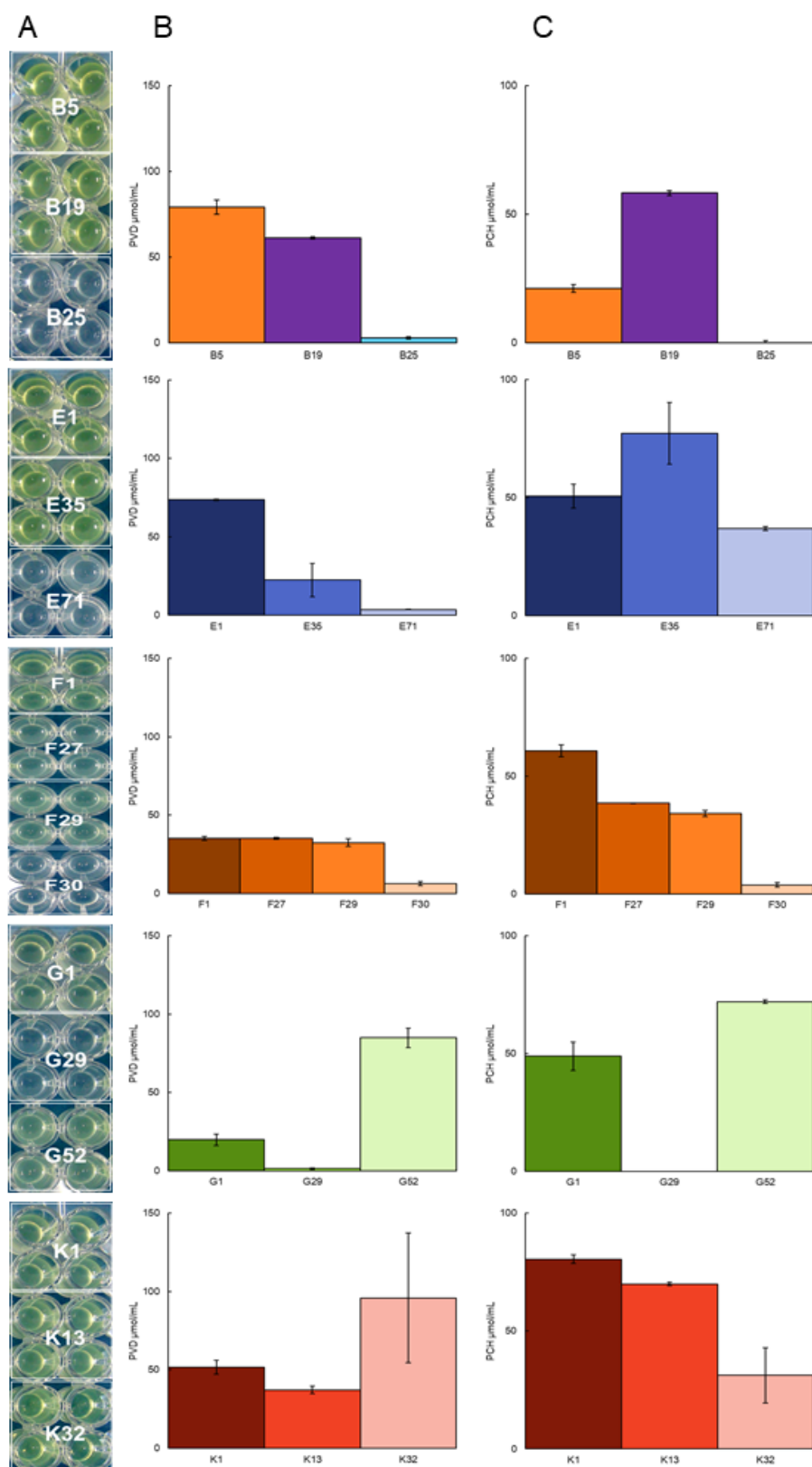


Figure 30 : Production de sidérophores des lignées B, E, F, G et K. A : aspect des cultures après 24 h de croissance en milieu CAA ; B : dosage de la PVD après 7 h de croissance en milieu MH chelex + 1 % sérum ; C : dosage de la PCH après 7 h de croissance en milieu MH chelex + 1 % sérum. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=2).

2.3. Evaluation de la production de biofilm des lignées longitudinales

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la collection d'isolats cliniques de Pa nous avons également quantifié la production de biofilm. Le biofilm est un facteur d'infection important, conférant de nombreux avantages aux bactéries dont une résistance au système immunitaire et aux ATB accrue et sa formation semble augmenter durant l'infection chronique (Evans, 2015). De plus, le fer est un élément impactant la production de biofilm puisque l'absence de fer semble limiter sa formation et la PVD semble elle-même impliquée, sa disparition semblant diminuer la formation de biofilm (Patriquin *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que PvdS est impliqué dans la formation des biofilms de types Psl et Pel (Banin *et al.*, 2005b). Cependant, le rôle de la PVD dans la formation de biofilm de type alginate, le type de biofilm majoritaire durant les infections chroniques, n'a quant à lui pas été démontré, même si en présence de fer les colonies mucoïdes (surproductrices d'alginate) ont tendance à réverter (Wiens *et al.*, 2014b). Cette information est intéressante car elle pourrait laisser sous-entendre qu'une perte de l'expression de la voie PVD et donc un accès au fer plus limité favoriserait l'apparition de colonies mucoïdes.

Nous avons donc voulu regarder rapidement si nous voyions un lien entre la perte de la production de PVD et une possible augmentation de la formation de biofilm chez nos isolats cliniques. Pour les isolats B25 et G29 (Figure 31), isolats ne produisant plus de PVD, nous pouvons effectivement observer une augmentation de la production de biofilm, mais cela n'est pas un cas général au sein de notre collection. Et pour certaines autres lignées la différence de formation de biofilm ne peut pas du tout être corrélée avec la diminution de la production de PVD (Figure 31). Cela n'est cependant pas surprenant, la formation des différents types de biofilm étant soumise à de nombreuses voies de régulation.

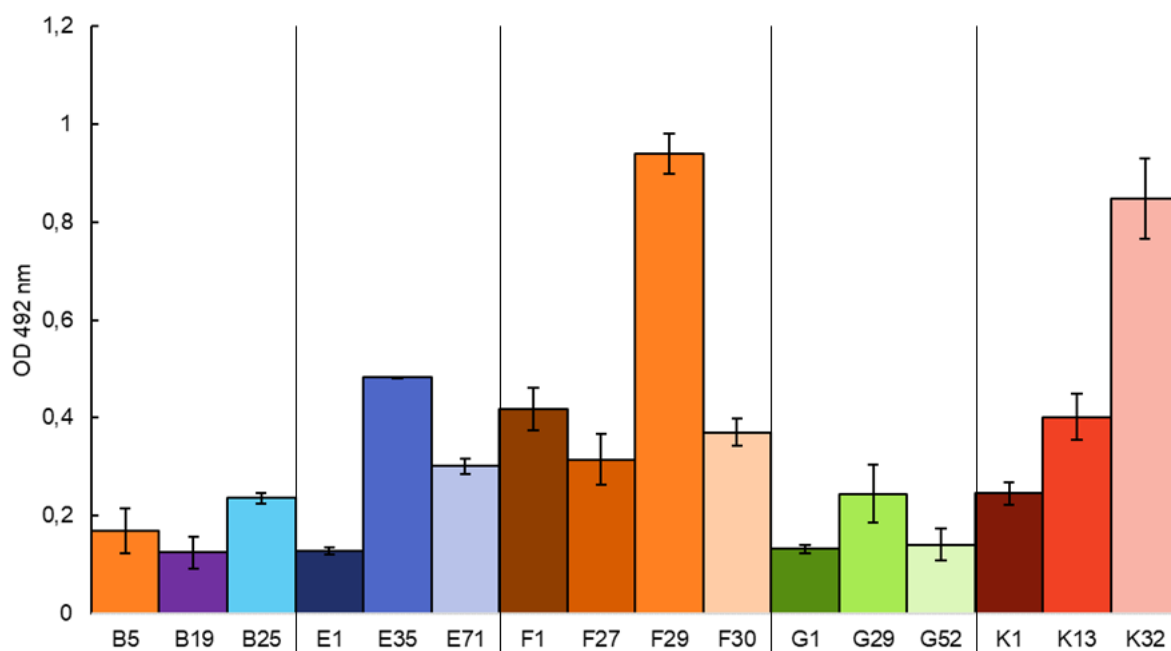


Figure 31 : Dosage de la production de biofilm pour les lignées E, F, G et K. Après 24h de croissance en milieu MH chelex + 1 %. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=2).

2.4. Etude de la mobilité

Pour aller encore plus loin dans la caractérisation de notre collection nous avons également observé les différents types de mobilité chez nos différents isolats. Il est intéressant de regarder la mobilité puisqu'au cours de l'infection, Pa va avoir tendance à perdre sa mobilité au profit de la formation de biofilm. De plus la mobilité elle-même va entraîner la formation du biofilm puisque les bactéries vont coloniser la surface par swarming avant d'adhérer *via* du twitching pour enfin commencer la formation du biofilm. De plus, une activation des gènes des voies PVD et PCH a été mise en évidence lors de mouvement de type swarming (Overhage *et al.*, 2008b), laissant suggérer un lien entre mobilité et production de sidérophores.

De façon générale nos isolats cliniques sont assez peu mobiles en comparaison à la souche PAO1 (Figure 32) et ce pour les deux types de mobilités observées. Seule la lignée K se démarque (Figure 32) avec une mobilité plus importante, qui semble cependant diminuer avec le temps de colonisation. Ces résultats sont à mettre en parallèle de ceux obtenus pour cette lignée au niveau de la production du biofilm, qui elle, augmente au cours du temps (Figure 31).

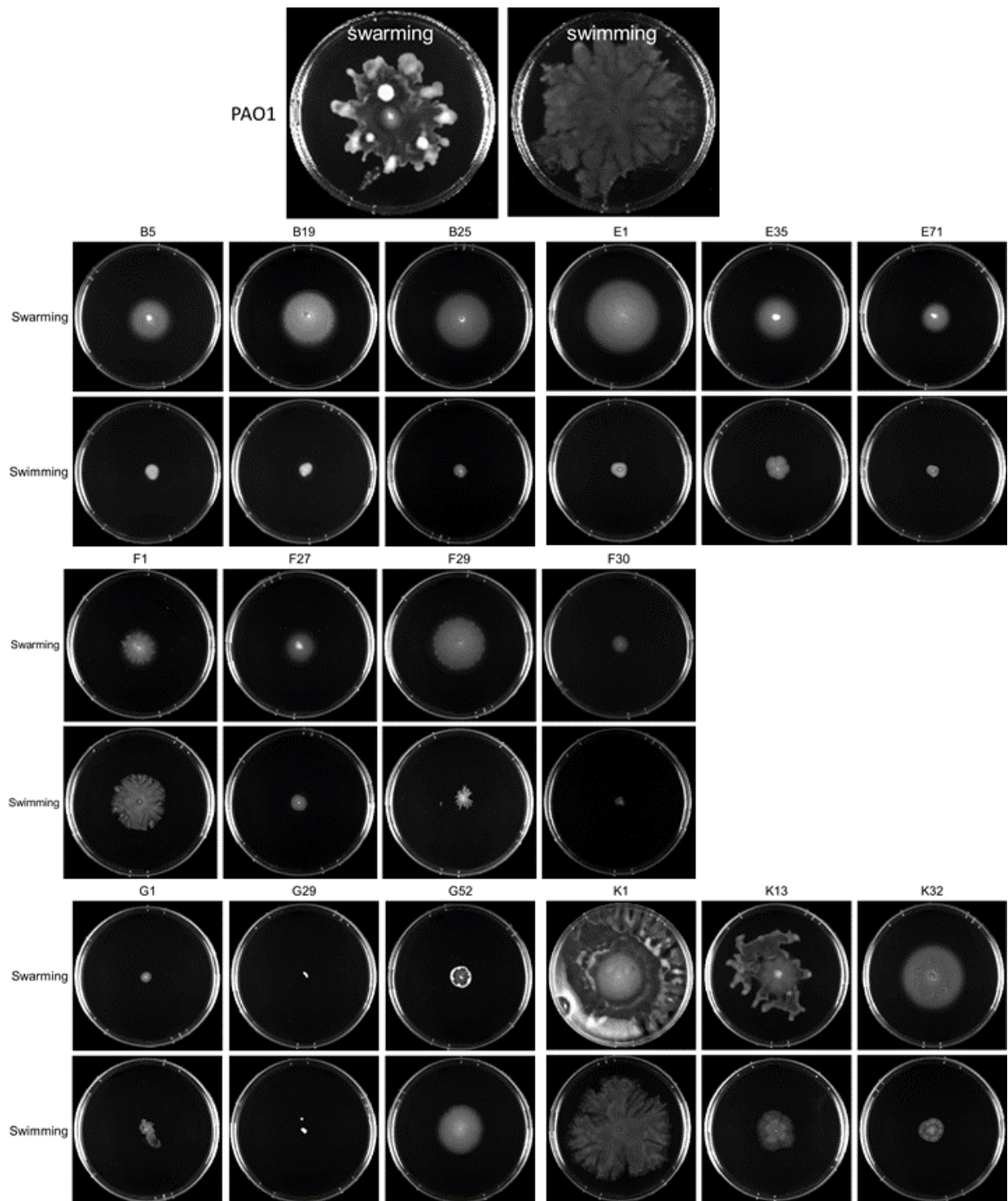


Figure 32 : Observation de la mobilité des lignées B, E, F, G et K et de la souche PAO1.

2.5. Antibiotogrammes

Pour aller encore plus loin dans la caractérisation de ces isolats nous avons également déterminé la résistance de toute la collection à différents ATB. Nous avons choisi de tester la

tobramycine, l'ofloxacine et la ticarcilline, qui sont les trois ATB utilisés dans le chapitre V de ce projet.

Globalement, les valeurs de CMI obtenues pour les isolats cliniques sont dans les mêmes ordres de grandeur que ceux de la souche PAO1 (Tableau 1). Presque toutes ont une CMI élevée pour la ticarcilline (sauf F29 et F30), qui peut s'expliquer par la présence de β -lactamases (AmpC) par exemple. Le seul autre résultat vraiment différent est l'isolat F30 qui montre une résistance à la tobramycine particulièrement forte. De manière générale, les résultats de CMI pour la tobramycine sont plus différents entre les isolats que ceux pour l'ofloxacine.

Tableau 1 : CMI de la collection d'isolats cliniques vis-à-vis de différents ATB. Les CMI ont été déterminées en réplicats biologiques (n = 3).

Souches de Pa	Tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)	Ofloxacine ($\mu\text{g/mL}$)	Ticarcilline ($\mu\text{g/mL}$)
PAO1	1	2	>64
B5	3	3	32
B19	6	1	48
B25	2	1	64
E1	8	2	64
E35	6	0,25	>64
E71	8	2	>64
F1	4	1	64
F27	ND	ND	ND
F29	8	0,187	8
F30	>64	0,25	8
G1	0,5	1	32
G29	ND	ND	ND
G52	0,5	0,5	24
K1	8	2	48
K13	8	1	64
K32	8	2	>64

2.6. Caractérisation de la PVD

Pour définir le type de PVD produit par nos différentes lignées, nous avons procédé à une Focalisation IsoElectrique (IEF). Cette technique permet de faire migrer la PVD en fonction de sa charge et donc de déterminer les différentes formes produites. Pour toutes les lignées en notre possession, deux isoformes de la PVD sont produits (Figure 33). Pour la lignée B, un troisième isoforme est visible en bas du gel. Il ne semble cependant pas y avoir de différences d'isoformes de PVD entre nos différentes lignées.

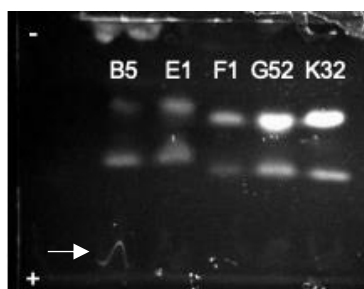


Figure 33 : IEF de la PVD des premiers isolats des différentes lignées de la collection.

L'ensemble de ces résultats nous ont poussé à étudier plus avant en premier lieu la lignée B, qui présente un profil d'évolution de sidérophores allant vers une perte de production des deux sidérophores, comme souvent décrit dans la littérature. Les autres lignées montrent une évolution plus contrastée, et leurs résultats peuvent être plus difficiles à appréhender.

3. Caractérisation plus poussée de la lignée B

3.1. Historique de la lignée

Comme toutes les autres lignées de notre collection, la lignée B provient de prélèvements d'expectorations réalisé chez un patient CF et infecté de façon chronique par Pa. A chaque prélèvement un clone présent dans l'expectoration a été isolé. Les caractéristiques physiologiques de ces isolats ont été déterminées. La lignée longitudinale « B », correspond à un patient de sexe féminin sévèrement infecté par un clone de Pa de génotype 1BAE (Wiehlmann *et al.*, 2007) dont la colonisation a débuté à l'âge de 9,5 ans (Klockgether *et al.*, 2018a). Dans cette lignée nous avons utilisé 3 isolats prélevés à des temps distincts de l'infection descendants tous du même clone de

départ (Figure 34). L'isolat B5 est le clone initial identifié chez la patiente, l'isolat B19 a été prélevé après plus de 9 mois d'infection et l'isolat B25 après presque 3 ans d'infection. Ce dernier a été caractérisé comme étant une souche hypermutatrice. Les arbres phylogénétiques des autres lignées de cette collection sont disponibles dans (Klockgether *et al.*, 2018a).

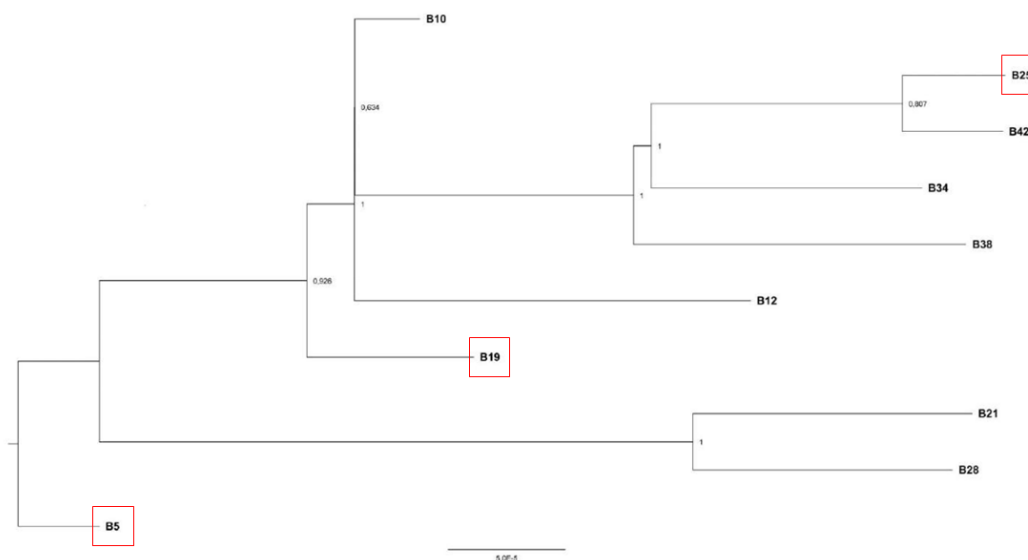


Figure 34 : Arbre phylogénétique de la lignée B. Obtenu à partir d'une analyse évolutive temporelle avec *tip-dating*, tiré de (Klockgether *et al.*, 2018a). Les isolats en notre possession sont entourés en rouge.

3.2. Comportement de la lignée dans le milieu choisi

Pour commencer nous avons suivi la croissance des isolats de la lignée B dans différents milieux de cultures et conditions. L'objectif était de déterminer l'impact de la présence du sérum sur la croissance, afin de voir si les conditions de culture que nous avons choisies étaient pertinentes.

Dans un premier temps nous avons déterminé la concentration en fer du milieu choisi, à savoir un milieu Mueller-Hinton II (MH) traité à la résine chelex (abrégé MH chelex) avec ajout de 1 % de sérum, en le comparant au milieux MH chelex et MH (Tableau 2). Cela nous a permis d'avoir une idée de la quantité de fer présente dans le milieu. Nous avons pu confirmer que notre traitement à la résine chelex permet bien d'appauvrir le milieu en fer puisqu'il contient plus de sept

fois moins de fer une fois traité. L'ajout de sérum dans le milieu permet de presque doubler la concentration en fer dans le milieu.

Tableau 2 : Dosage de la concentration en fer dans différents milieux de culture par ICP-AES. Les dosages ont été réalisés en réplicats (n = 3).

Milieu	Concentration massique (mg/L)	Concentration molaire ($\mu\text{mol/L}$)
Milieu MH	0,244	4,38
Milieu MH chelex	0,033	0,60
Milieu MH chelex + 1 %	0,055	0,98

Dans la [figure 35](#) nous avons comparé la croissance des isolats de la lignée B en présence ou absence de sérum et l'impact de la PVD dans ces conditions et ce à 7 et 24 h de culture soit en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire. A 7h de culture, les souches B5 et B19 poussent moins bien en milieu MH chelex + 1 % sérum qu'en milieu MH chelex, ce qui peut être dû à la non-biodisponibilité du fer, ou à d'autres facteurs présents dans le milieu. En rajoutant de la PVD, on restaure effectivement la croissance de B5 ou B19 observée en milieu MH chelex, ce qui montre que cette différence de croissance observée est bien due essentiellement à stress ferrique. Par ailleurs, l'ajout de PVD à B5 ou B19 en milieu MH chelex n'a pas d'effet sur la croissance, la production de PVD étant suffisante à pourvoir la bactérie en fer. Ces résultats montrent l'importance des sidérophores dans des milieux concurrentiels.

La souche B25 pousse moins bien que les souches B5 ou B19, ce qui à nouveau peut être dû à la perte de production de sidérophores mais aussi à d'autres évolutions. L'ajout de PVD à la souche B25 permet un gain de croissance plus important que pour les souches B5 ou B19 (proche de 2) ([Figure 35](#)), ce qui montre que la perte de production de sidérophores pèse sur la croissance et n'est pas entièrement compensée par l'utilisation des chélateurs de l'hôte (le protéome, présenté plus bas, confirme effectivement la surproduction dans la souche B25 de transporteurs liés à l'hème, [Figure 38](#)). Au niveau évolutif, si cette perte de production de sidérophores, permise notamment par la présence de chélateurs de l'hôte conduit à des économies d'énergie, elle a un coût en termes de croissance. L'économie d'énergie réalisée, permise par la présence de chélateurs exogènes, n'est donc probablement pas le seul moteur de cette évolution.

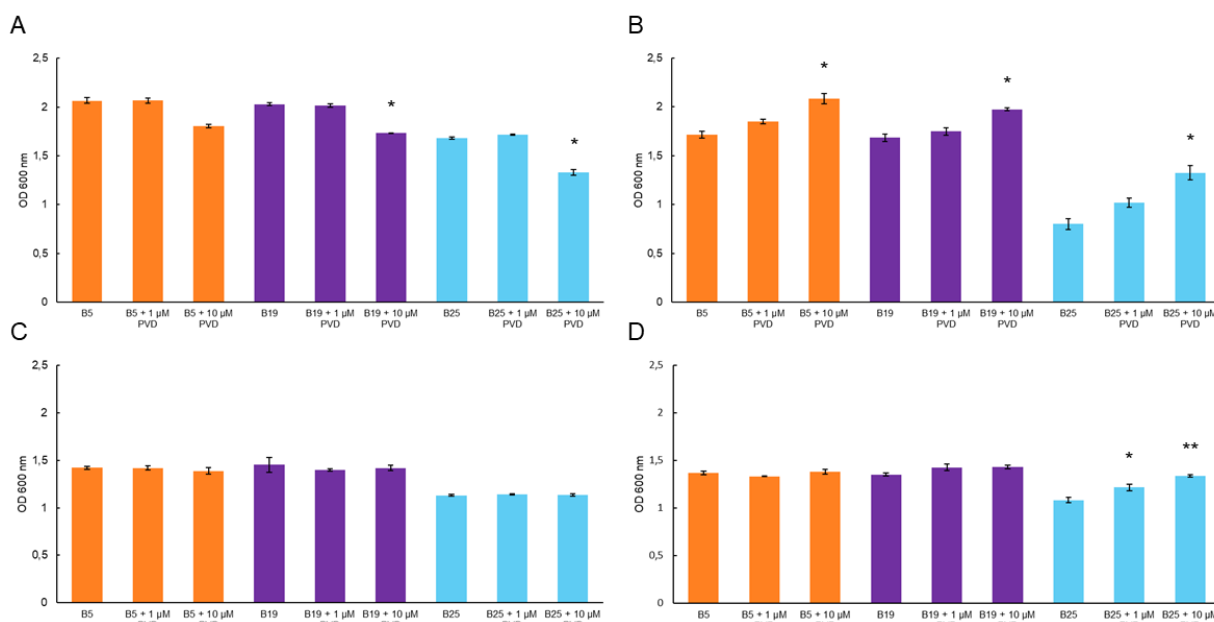


Figure 35 : DO₆₀₀ de cultures de Pa lignée B après 7 ou 24 h de croissance. A : après 7 h de croissance en milieu MH chelex ; B : après 7 h de croissance en milieu MH chelex + 1 % sérum ; C : après 24 h de croissance en milieu MH chelex ; D : après 24 h de croissance en milieu MH chelex + 1 % sérum. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3), les barres avec * sont significativement différentes à $p = 0,05$ (test ANOVA ou Kurskal-Wallis selon la répartition des échantillons).

Nous avons également comparé la production de PVD et PCH (rapportée à la DO) dans ces deux milieux. La production de PVD est plus faible en milieu MH chelex qu'en milieu MH chelex + 1 % sérum et la production de PCH est presque négligeable en milieu MH chelex (Figure 36 en regard de la Figure 30). Ces résultats suggèrent que bien que le milieu MH chelex soit pauvre en fer, la bactérie n'a pas besoin de déployer tout son arsenal de sidérophores. En milieu MH chelex + 1 % sérum, alors que la concentration en fer est supérieure, la bactérie utilise tout son potentiel, PVD et PCH, ce qui reflète bien une plus faible biodisponibilité du fer dans ce milieu. Le fer présent est bien chélaté par les protéines présentes dans le sérum.

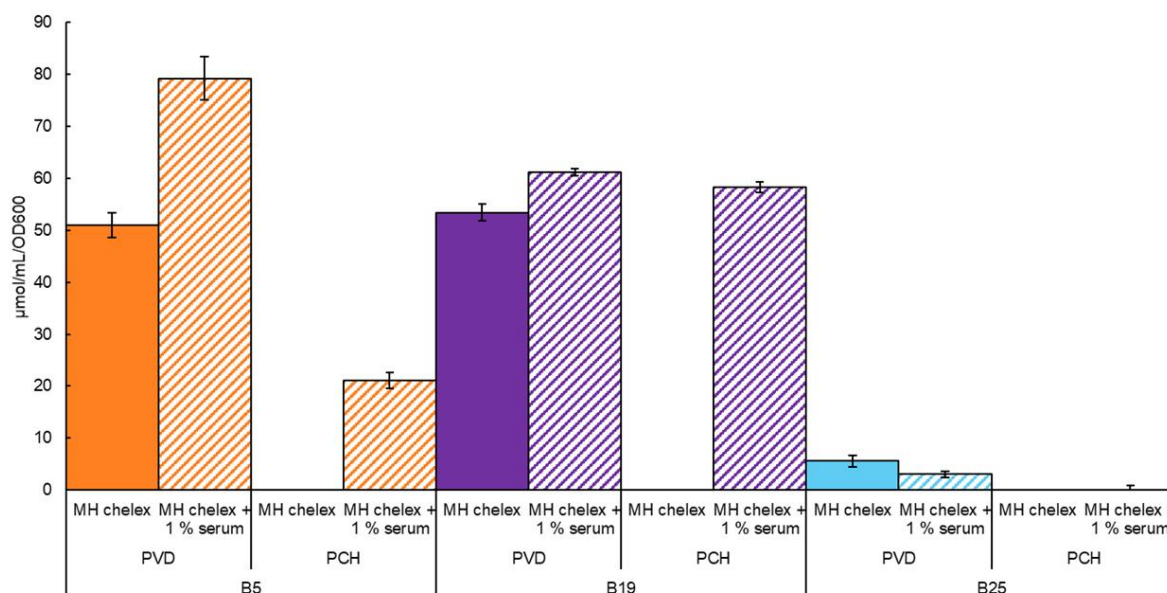


Figure 36 : Comparaison de la production de sidérophores de la lignée B en milieu MH chelex avec/sans sérum. Les dosages ont été réalisés après 7h de croissance. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3).

3.3. Effet de l'ajout de PVD sur la croissance de l'isolat B25

Une fois les conditions de croissance bien définies nous avons étudié plus en détail le comportement de croissance de la lignée B. Pour cela nous avons procédé à un suivi de croissance des différents isolats. L'isolat B25 se développe effectivement moins bien que les isolats B5 et B19. Nous avons tenté de voir si cela pouvait être lié à sa perte de production de PVD. Lorsqu'on supplémente le milieu en PVD, sa croissance est partiellement restaurée et ce de façon dose-dépendante jusqu'à doubler en présence de 10 μ M de PVD (Figure 37). Cela signifie que bien que ne produisant plus de PVD, l'isolat B25 est toujours capable de l'importer. En revanche, malgré la présence de PVD sa croissance n'atteint pas les mêmes valeurs que celle des isolats B5 et B19, ce qui témoigne tout de même d'un manque d'accès au fer.

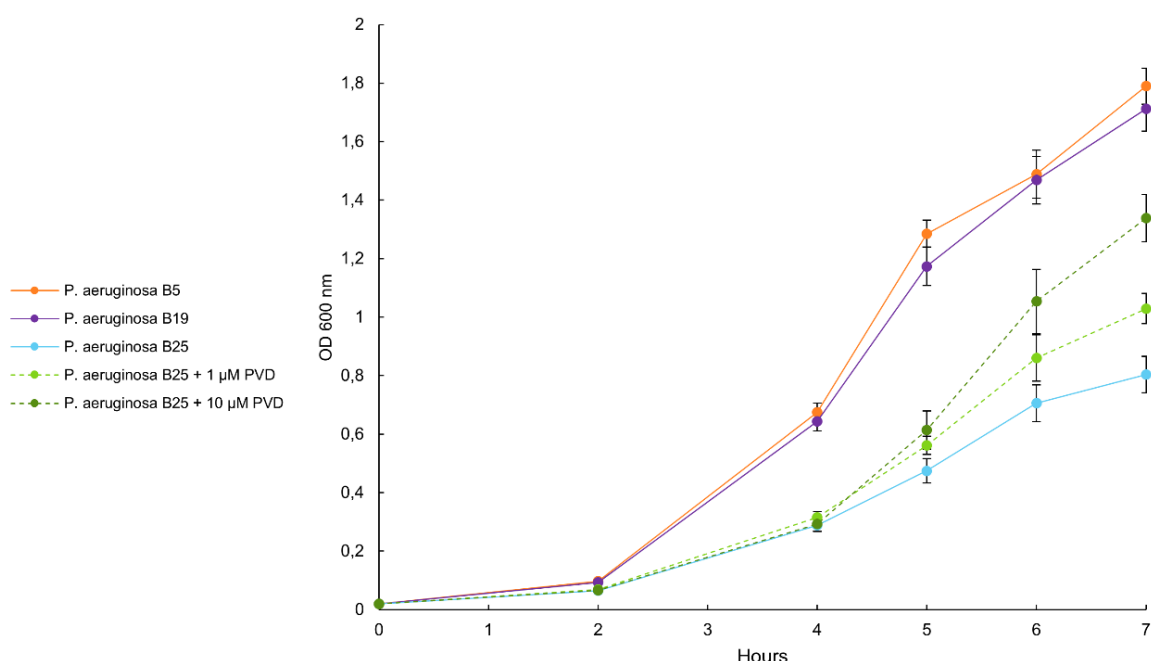


Figure 37 : Suivi de la croissance des isolats de la lignée B en milieu MH chelex + 1 % sérum par mesure de la DO_{600} . Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ($n = 3$).

3.4. Analyse protéomique

Pour avoir une vue d'ensemble plus complète des évolutions entre les différents isolats de la lignée B nous avons procédé à une analyse du protéome de ces 3 isolats. Extrêmement peu de différences sont visibles entre les isolats B5 et B19 (Figure 38 A). Les seules protéines ayant une différence d'expression significative sont des protéines de la voie PCH surexprimées chez l'isolat B19. Ces résultats sont constants avec les quantités de sidérophores observées (Figure 30). Cette si petite variation du protéome entre ces deux isolats nous indique que la souche est restée très stable durant un long moment de l'infection. En revanche l'isolat B25 est quant à lui bien différent (Figure 38 B). Beaucoup plus de modifications ont eu lieu dans l'expression de son protéome avec une diminution d'expression de nombreux facteurs de virulences tels que les deux voies des sidérophores (consistant avec ce qui est observable en dosage de sidérophores), la voie du *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) (jouant elle-même un rôle dans l'expression de différents facteurs de virulence), la pompe de résistance aux ATB MexAB-OprM ou encore des gènes impliqués dans la formation de biofilm de type alginate ainsi que le régulateur négatif de la voie Psl (AmrZ). La surexpression de quelques gènes impliqués dans l'import du fer *via* l'acquisition de l'hème (PhuR, HmuV) ainsi que FoxR impliqué dans la voie d'import des sidérophores de type hydroxamate et

de molécules de l'hôte ressort également. Cela témoigne bien d'une diminution de la virulence chez cet isolat et d'une adaptation à l'environnement pulmonaire.

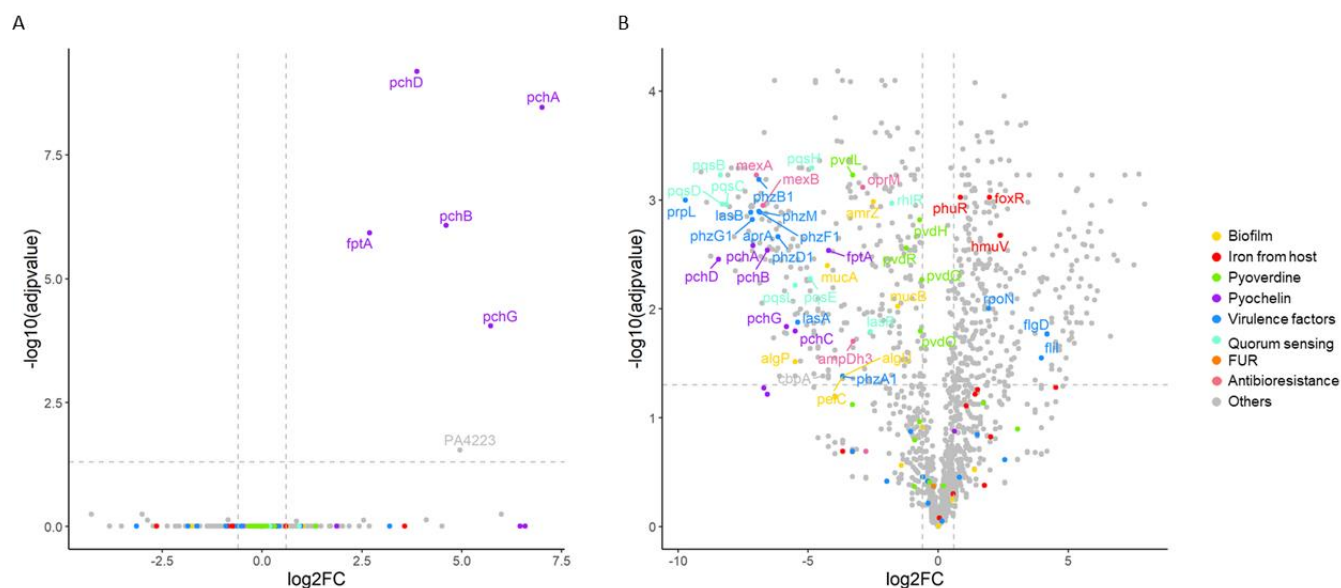


Figure 38 : Variations du protéome chez les isolats de la lignée B. A : différences d'expression des protéines entre l'isolat B19 et B5 ; B : différences d'expression des protéines entre l'isolat B25 et B19. Les expériences ont été réalisées en réplicats biologiques ($n = 3$) et la p -value déterminée par la plateforme de protéomique.

Pour confirmer les résultats obtenus en protéomique nous avons également fait des analyses transcriptomiques par RT-qPCR. Pour cela nous avons choisi un gène par catégorie de gènes sur lesquels nous nous sommes plus particulièrement penchés (biofilm, acquisition du fer *via* les protéines de l'hôte, voies des sidérophores, facteurs de virulences, QS). Après avoir validé l'utilisation de couples d'amorces designés pour la souche PAO1, nous avons pu mettre en évidence que les résultats observés pour les gènes choisis en protéomiques suivent les mêmes tendances par analyse de leurs transcrits (Figure 39).

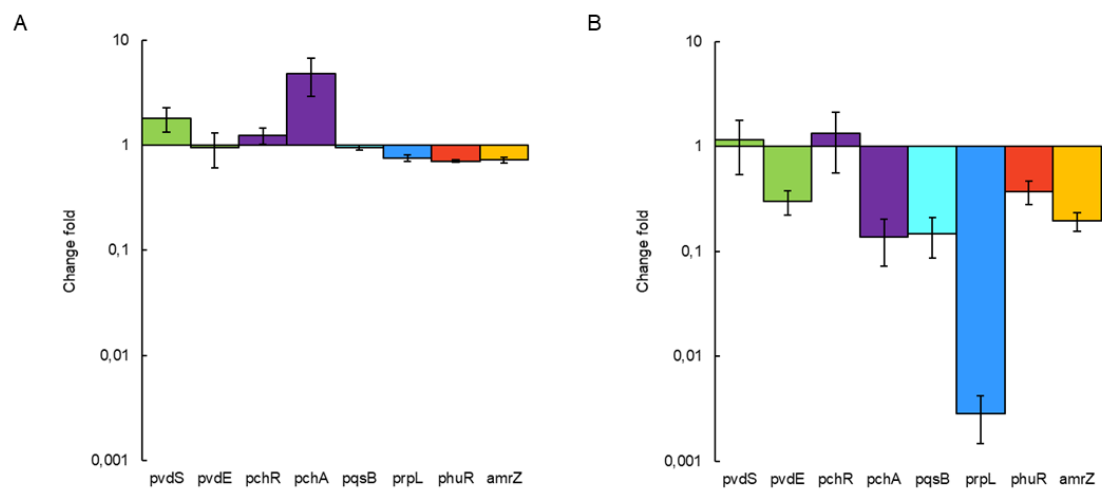


Figure 39 : Variation du nombre de transcrits entre les différents isolats de la lignée B par RT-qPCR. A : comparaison de l'isolat B19 par rapport à l'isolat B5 ; comparaison de l'isolat B25 par rapport l'isolat B19. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ($n = 3$).

Chapitre IV

Interactions de *P. aeruginosa* avec autres
bactéries pathogènes – focus sur le rôle
de ses sidérophores

1. Pouvoir chélateur des différentes bactéries

Avant d'étudier les différentes interactions possibles, nous avons déterminé le pouvoir chélateur de chaque bactérie. Pour cela, nous avons testé les surnageants de culture des différentes souches obtenus dans les conditions dans lesquelles ils seront utilisés pour la suite des expérimentations. Les tests au Chrome Azurol S (CAS) ont été utilisés pour évaluer la capacité des différents surnageants utilisés pour chélater le fer. Le CAS est un chélateur du fer qui devient bleu lorsqu'il est complexé au fer, et rose lorsqu'il est libre. Le suivi de la DO à 630 nm (DO_{630} , couleur bleue) a permis de comparer la capacité des différents surnageants utilisés pour chélater le fer. Lorsque la DO_{630} diminue, cela correspond à une diminution de la chélation du fer par le CAS et donc à une compétition pour la chélation du fer par le surnageant ajouté (Figure 40). Les surnageants utilisés ont été obtenus à partir de cultures dans du MH chelex + 1 % sérum pendant 20 h à 37°C. De manière surprenante, même si les bactéries sont connues pour produire des sidérophores, tous les surnageants n'ont pas été capables de concurrencer le CAS pour la chélation du fer. Parmi tous nos concurrents (Ax, Bc, Bm, Sa, Sm), seuls les surnageants Ax et Bc contenaient des chélateurs du fer capables de concurrencer le CAS. Leur niveau de compétition avec le CAS était similaire à celui des isolats B5 et B19 de Pa (Figure 40). Comme témoins, de la PVD et de la PCH ont été ajoutées à des concentrations similaires à celles produites par la souche B5 après 20h de culture. A notre connaissance, aucun sidérophore n'a été décrit pour Ax. Ces résultats suggèrent qu'Ax sécrète une molécule capable de chélater le fer ou au moins de libérer le fer de son complexe avec le CAS. Bc produit de la PCH (Butt and Thomas, 2017b), ce qui explique la compétition observée avec le CAS. Les souches B5 et B19 sont également capables d'entrer en compétition avec le CAS, tandis que le surnageant de B25 ne l'est pas, montrant encore une fois que cet isolat ne produit plus de sidérophores.

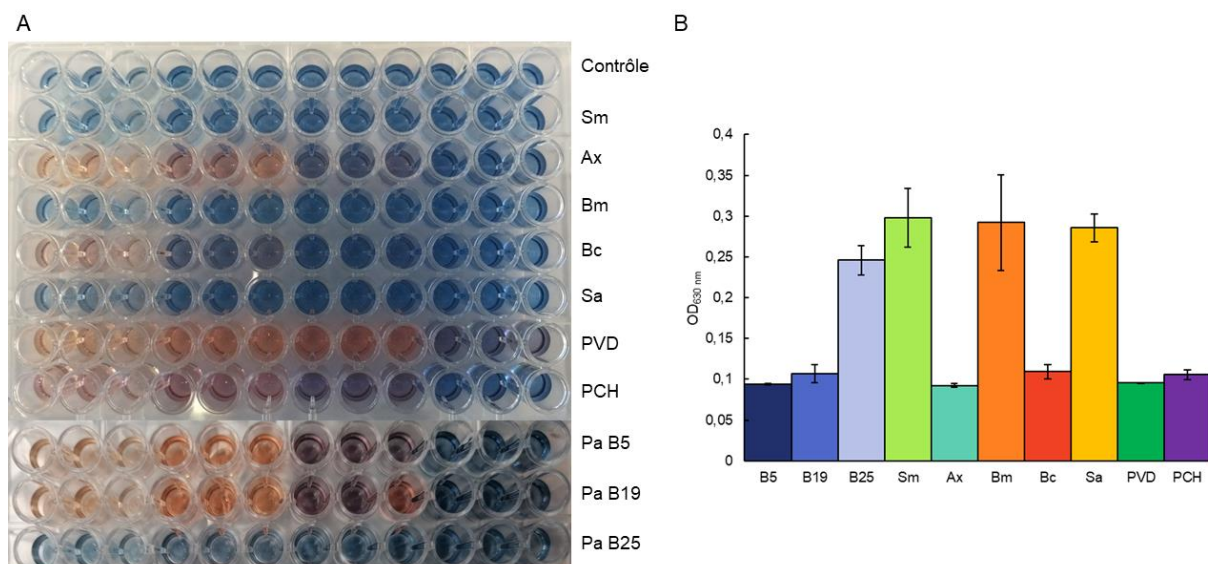


Figure 40 : Compétition pour le fer entre CAS et surnageants de culture des bactéries. A : photo des plaques du test, les lignes correspondent à des cascades de dilution pour chaque condition ; B : résultats des absorbances obtenues à DO630 pour les puits non-dilués (1^{ère} colonne). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3).

2. Etude de l'impact du sécrétome sur la compétition entre bactéries

Les sidérophores peuvent jouer deux rôles dans les interactions entre bactéries : un rôle dans l'import du fer pour la bactérie qui le produit et un rôle de facteur de virulence en privant notamment les autres bactéries de fer. Nous avons étudié l'importance des sidérophores de Pa pour l'import du fer en suivant la croissance des Pa cliniques en présence de surnageants d'autres bactéries et analysé l'importance des sidérophores comme facteurs de virulence en suivant la croissance de ces autres bactéries en présence de surnageant de Pa.

2.1. Effet des surnageants de bactéries compétitrices sur la croissance de *P. aeruginosa* et sa production de sidérophores

La croissance des souches B5 et B19 en présence des différents surnageants, se révèlent similaires, ce qui est cohérent avec l'étude du protéome de ces souches qui ne présente que peu de différences (Figure 41 A). Seul le surnageant de Bm induit une baisse significative de croissance de

Pa après 7h de culture (>20%). C'est aussi la seule souche pour laquelle une hausse de production de PVD est observée (Figure 41 B).

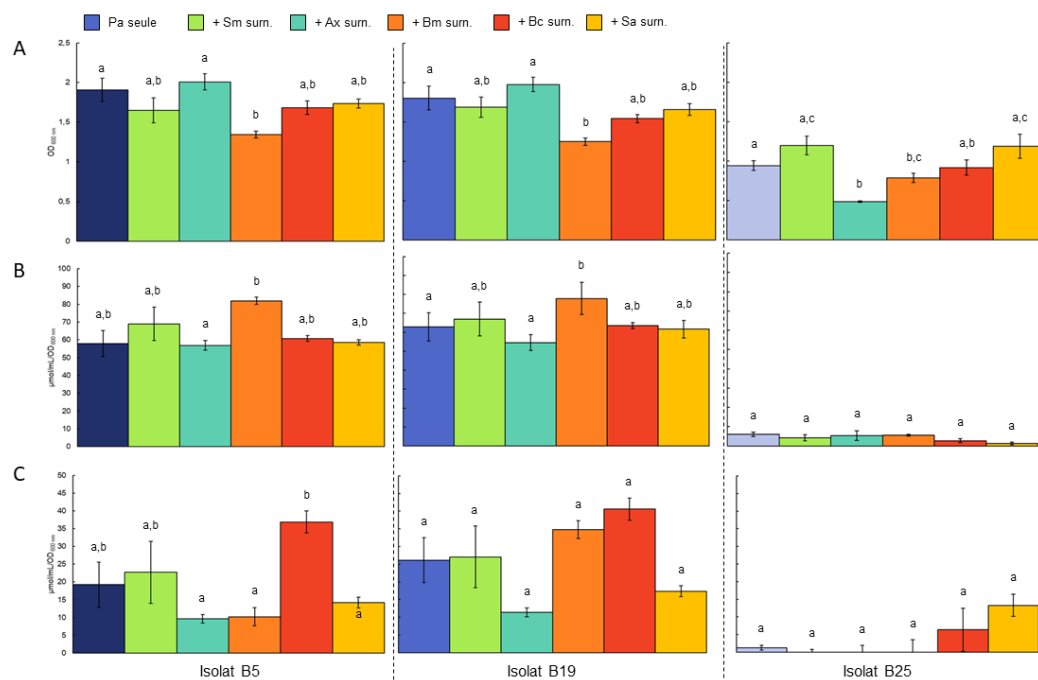


Figure 41 : Effet des surnageants des bactéries compétitrices sur la lignée B de Pa. A : DO₆₀₀ après 7 h d'incubation ; B : Dosage de la PVD après 7 h d'incubation ; C : Dosage de la PCH après 7 h d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3), les barres avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$ (test ANOVA).

Différentes études avaient déjà montré que la compétition pour la chélation de fer a des conséquences sur la production de sidérophores. Ainsi, en absence ou présence de faibles compétiteurs, ni la PCH ni la PVD ne voient leur production affectée. En présence de compétition moyenne (présence soit de chélateur ayant une affinité intermédiaire pour le fer, soit de chélateur ayant une forte affinité mais en concentration faible), la production de PCH diminue mais pas celle de PVD. En présence de forte compétition (chélateur fort, forte concentration), la production des deux sidérophores baisse. Ces résultats sont en accord avec la présence d'une boucle d'auto-activation (Figure 28) : la présence de complexe ferri-sidérophore est nécessaire à la production du sidérophore. Ainsi, plus la compétition pour le fer est forte, plus elle peut entraîner une diminution de la concentration en complexe ferri-sidérophore et donc la diminution de la production de sidérophores. Nos résultats concernant la production de sidérophores semblent être globalement en accord avec ces données. En effet, Sm et Sa ne produisent pas de chélateurs forts d'après les résultats du test CAS, et n'induisent effectivement pas de différence significative de production de

sidérophores (Figure 41 B et C). Ax au contraire, produit un chélateur plus fort, qui peut entrer en compétition avec la PCH ou la PVD. Dans ce cas, on observe bien une diminution de la production de PCH (Figure 41 C), mais pas de PVD (Figure 41 B) qui est un chélateur bien plus fort d'après les résultats du test CAS. D'après ces mêmes résultats, Bc produit également des chélateurs forts (ornibactine et PCH). Dans ce cas, la présence de cette PCH supplémentaire se traduit par une plus forte stimulation de la boucle d'autorégulation de la PCH, et donc une augmentation de la production de cette dernière (Figure 41 C). Ces résultats confirment effectivement que Pa adapte sa production de sidérophores au milieu et à la compétition pour le fer, et que la production de sidérophores pourrait servir de mesure de la compétition pour le fer dans la condition étudiée.

Ceci n'est cependant pas une donnée générale. Le surnageant de la bactérie Bm diminue significativement la croissance de Pa (>20%) (Figure 41 A), mais cette bactérie ne produit pas de chélateur fort de fer d'après nos résultats de test CAS. Or dans ce cas, la production de PVD augmente, et celle de PCH diminue pour B5 (mais pas pour B19, un surproducteur de PCH d'après les résultats de protéomique, Figure 38). Cette surproduction de PVD a déjà été observée en condition de co-culture, uniquement lorsque le milieu est pauvre en fer (par exemple (Leinweber *et al.*, 2018)). Dans ce cas, Pa répond à la compétition, ou à certains facteurs du surnageant en surproduisant la PVD, afin très probablement de priver l'autre bactérie de fer. Nos résultats de test CAS semblent indiquer que cette réponse de Pa n'est pas liée à la présence de chélateur fort (et donc à une difficulté supplémentaire d'approvisionnement en fer), mais induite par d'autres signaux liés à la perte de croissance observée. Dans ce sens, il est à noter que la souche Pa B25, qui ne produit plus que très peu de sidérophores, ne montre pas de diminution de croissance lorsque le surnageant de Bm est ajouté, ce qui semble indiquer que le stress ferrique n'est pas augmenté en présence de ce surnageant.

Les résultats concernant la souche B25 montrent peu d'effet des surnageants des autres bactéries sur sa croissance, hormis le surnageant d'Ax, qui induit une diminution de la croissance (Figure 41 A). La perte de production de PVD et PCH ne semble donc pas affecter la croissance de B25 en présence des compétiteurs, sauf pour Ax. Dans ce cas, nous avons rajouté de la PVD à la culture de B25, ce qui a permis de restaurer la croissance observée lorsque B25 est cultivée sans surnageant : la perte de production de PVD et PCH entraîne bien un défaut de compétition avec les chélateurs produits par Ax et donc un défaut d'approvisionnement en fer (Figure 42). Dans le cas de Bc, même si cette souche produit des chélateurs (PCH notamment, Figure 40), ceux-ci n'influent pas sur la croissance de B25 (Figure 41 A). Au contraire, on observe même une augmentation de production de PCH (Figure 41 C), ce qui montre que la boucle d'auto-activation est toujours active dans le contexte B25. Le surnageant de Sa induit une meilleure croissance de Pa

(Figure 41 A), ce qui avait déjà été observé par ailleurs, qui peut être lié soit à la production d'acétoïne par Sa et métabolisée par Pa (Camus *et al.*, 2020), soit à la protection de mutants *lasR* (c'est le cas de B25, Figure 38) dans un environnement oxydant (Hoffman *et al.*, 2010). D'autres facteurs pourraient aussi expliquer ce phénomène. Facteurs qui pourraient permettre également un meilleur accès au fer. On observe en effet une surproduction de PCH après ajout de surnageant de Sa (Figure 41 C), ce qui indique que cette boucle d'auto-activation est plus fortement induite en présence de surnageant de Sa. De plus, l'ajout de PVD n'augmente pas la croissance de Pa en présence du surnageant de Sa (Figure 42). L'ajout de PVD à la souche B25 permet d'améliorer la croissance en présence ou non de surnageants de compétiteurs, sauf effectivement dans ce cas, qui semble donc apporter une autre source de fer à Pa. Dans ces conditions, Pa peut alors se passer de PVD.

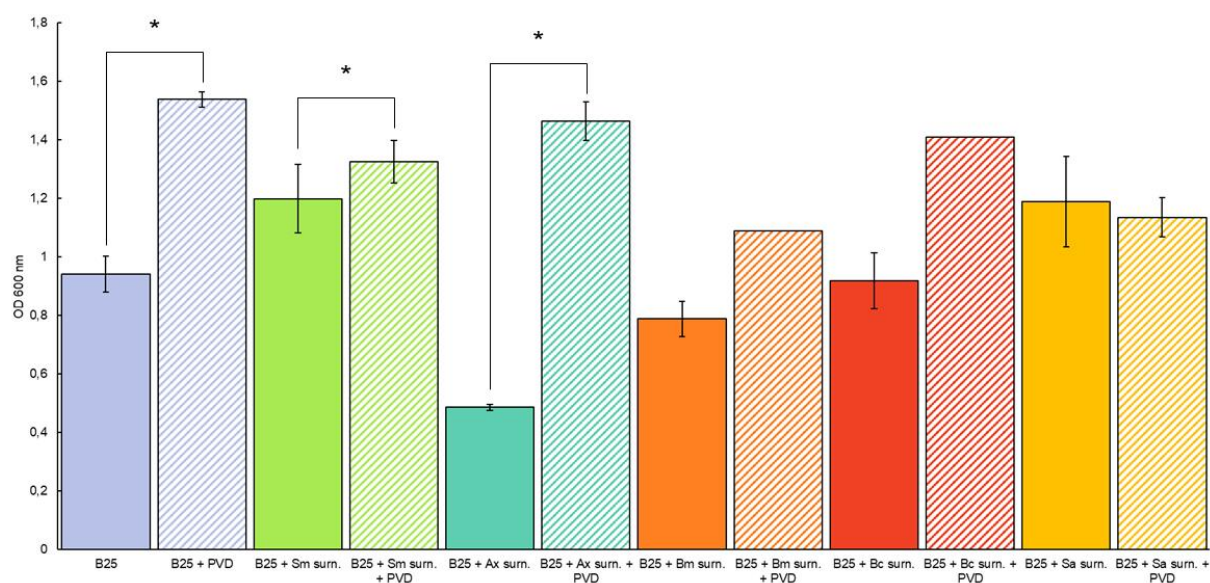


Figure 42 : Effet de l'ajout de PVD sur la croissance de la souche B25 en présence des surnageants de compétitrices. La PVD a été ajoutée à une concentration de 10 μ M. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ($n = 3$), les * indiquent une différence significative $p = 0,05$ (test T de Student).

En conclusion, lorsque les souches compétitrices ne produisent pas de chélateurs forts, ou des chélateurs pouvant être utilisés par Pa, l'ajout de surnageants de cultures de ces bactéries à la culture de Pa n'induit pas de stress ferrique important. En présence d'un chélateur plus fort (comme dans le cas d'Ax), la croissance de Pa peut être affectée si la souche produit peu de sidérophores (comme B25). Cependant, la régulation de la production des sidérophores est plus complexe, et

pourrait répondre à d'autres nécessités qu'uniquement l'import en fer, comme le fait de priver les autres bactéries de fer, et donc agir en tant que facteur de virulence.

2.2. Effet du surnageant de *P. aeruginosa* sur la croissance de bactéries compétitrices

Nous avons dans un deuxième temps rajouté du surnageant de culture des souches B5, B19 ou B25 à la culture de nos 5 bactéries compétitrices.

Nous observons un très fort effet des surnageants de B5, B19 sur la croissance de Sm, Bm et Bc (Figure 43 A, C et D). Cet effet est partiellement perdu lorsque le surnageant de la souche B25 est utilisé, mais additionné de PVD (Figure 43 A, C et D). La PVD est ainsi importante pour la virulence de Pa sur ces trois souches, mais ne suffit pas à expliquer l'effet des surnageants de B5 et B19. Les effets des surnageants de B5 et B19 sont moins importants sur Sa, et ils sont perdus lorsque le surnageant de B25 est utilisé (Figure 43 E). En rajoutant de la PVD au surnageant de B25, l'effet de B5 ou B19 est restauré dans tous les cas (Figure 43). Ce résultat montre que la perte de production de PVD explique à elle seule la perte de virulence du surnageant de B25 par rapport aux surnageants de B5 et B19. Enfin, pour Ax, nous observons même une augmentation de croissance lorsque du surnageant de B5 ou B19 est ajouté, effet qui là aussi est perdu lorsque B25 est utilisé (Figure 43 B). Et à nouveau, cet effet est restauré en rajoutant de la PVD au surnageant de B25.

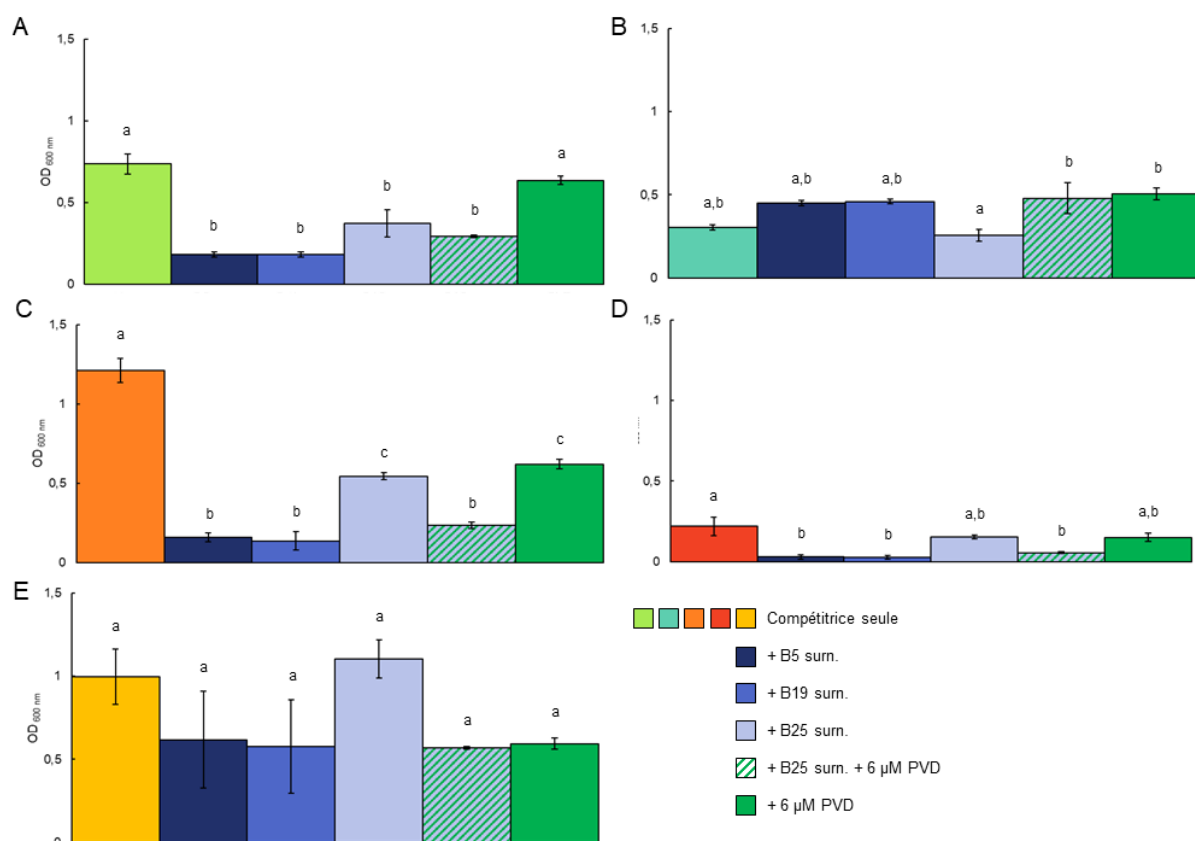


Figure 43 : Effet des surnageants des souches de la lignée B de *Pa* sur la croissance des bactéries compétitrices. DO₆₀₀ après 7 h d'incubation. A : Sm ; B : Ax ; C : Bm ; D : Bc ; E : Sa. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (n = 3), les barres avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$ (test ANOVA).

Nous avons ensuite ajouté directement de la PVD ou de la PCH purifiées à des cultures des bactéries compétitrices, en quantité équivalentes à ce que produit la souche B5 après 20 h de culture (Figure 44). Nous observons dans ce cas que l'effet du surnageant de B5 sur la croissance d'Ax et Sa (Figure 43 B et E) peut être obtenu uniquement par ajout de PVD (Figure 44). Nous observons également que pour les trois autres bactéries (Sm, Bm et Bc), les sidérophores influent sur la croissance, mais ne suffisent pas à expliquer l'effet de B5 (Figure 43 A, C et D vs Figure 44). Il semblerait également qu'Ax soit capable d'utiliser la PVD et la PCH pour sa propre croissance (Figure 44).

D'après nos résultats, le rôle de la PCH en tant que facteur de virulence est loin d'être secondaire : en effet, les effets de la PCH sur Sm, Ax ou Bm sont proches de ceux obtenus avec PVD (alors même que la concentration utilisée, qui reflète la concentration produite par B5, est plus faible). Elle n'a par contre aucun effet sur Sa, et très peu sur Bc, qui produit elle aussi la PCH

et est donc probablement capable de gérer un excès de PCH (Figure 44). Si le rôle de la PVD est lié à sa capacité à priver de fer la bactérie compétitrice, le rôle de la PCH peut être plus nuancé. Plusieurs exemples montrent que la ferri-PCH₂ peut être importées par différentes bactéries et dans ce cas induire un stress oxydatif. Cela a été décrit pour *E. coli* (Adler *et al.*, 2014), *Sm* (Pan *et al.*, 2021). L'absence d'effet de la PCH sur *Sa* sera à mettre en parallèle avec l'induction de production de PCH par le surnageant de *Sa*. Les échanges autour du fer entre ces deux bactéries seront à étayer.

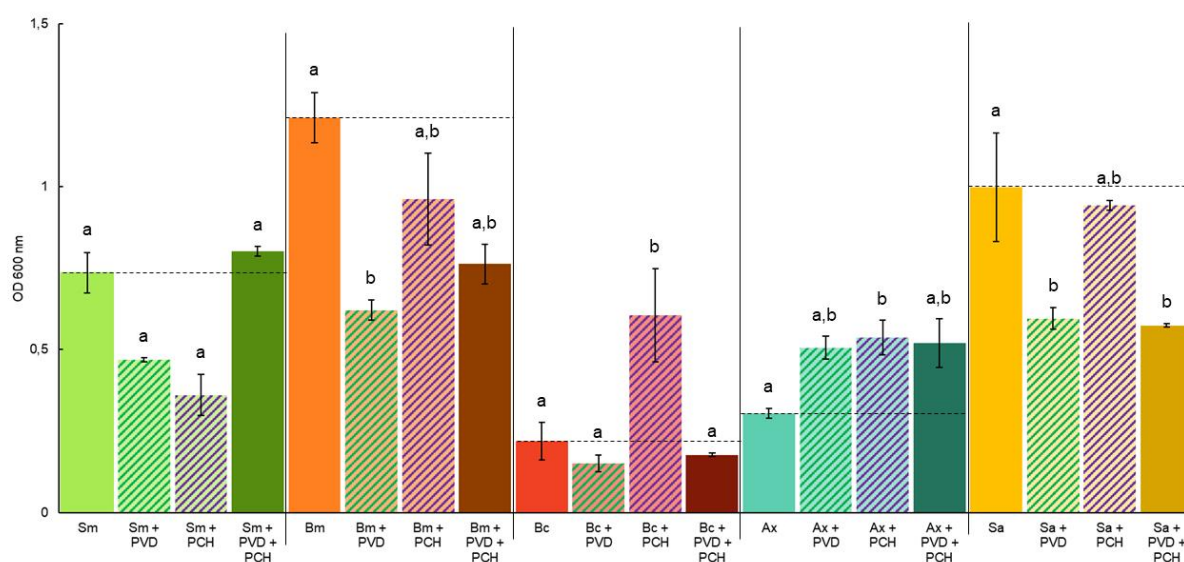


Figure 44 : Croissance des bactéries compétitrices en présence de sidérophores purifiés. DO₆₀₀ après 7 h d'incubation. La PVD a été ajoutée à une concentration de 6 µM et la PCH de 2 µM. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (n = 3), les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$ (test ANOVA), chaque compétitrice et ses conditions ont été testées indépendamment.

2.3. Etude des interactions entre *P. aeruginosa* et les compétitrices en contact direct

Enfin, nous avons cultivé directement ensemble les différents isolats de *Pa* avec les souches compétitrices. Nous avons inoculé les souches *Pa*/compétitrices en ratio 1/1 ou 1/50. Des aliquots sont prélevés à différents temps de culture et des dilutions étalées sur boîte. Les souches de *Pa* ayant été marquées chromosomiquement avec un marqueur fluorescent (mCherry), il est aisé de différencier les souches sur boîte LB (voir Chapitre II). Très peu de compétiteurs sont capables de pousser pour le ratio 1/1 lorsque la souche B5 est utilisée (Figure 45). Même si la souche B25

semble moins virulente, elle domine néanmoins elle aussi très rapidement les souches compétitrices.

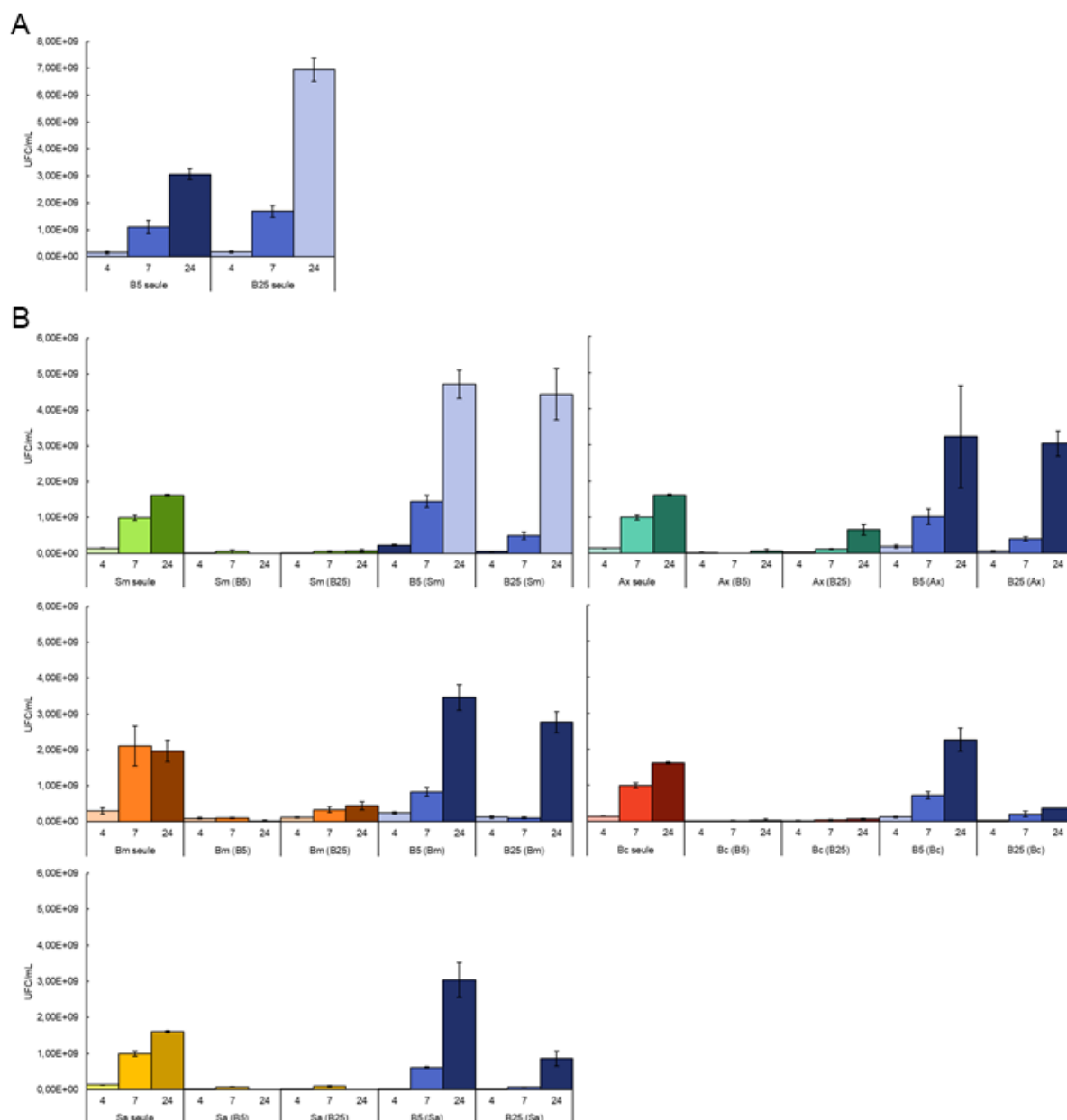


Figure 45 : Résultats des co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices au ratio 1-1. Les résultats ont été obtenus par dénombrement bactérien. A : résultats pour les isolats B5 et B25 seuls ; B : résultats pour les compétitrices seules et leurs mélanges. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3).

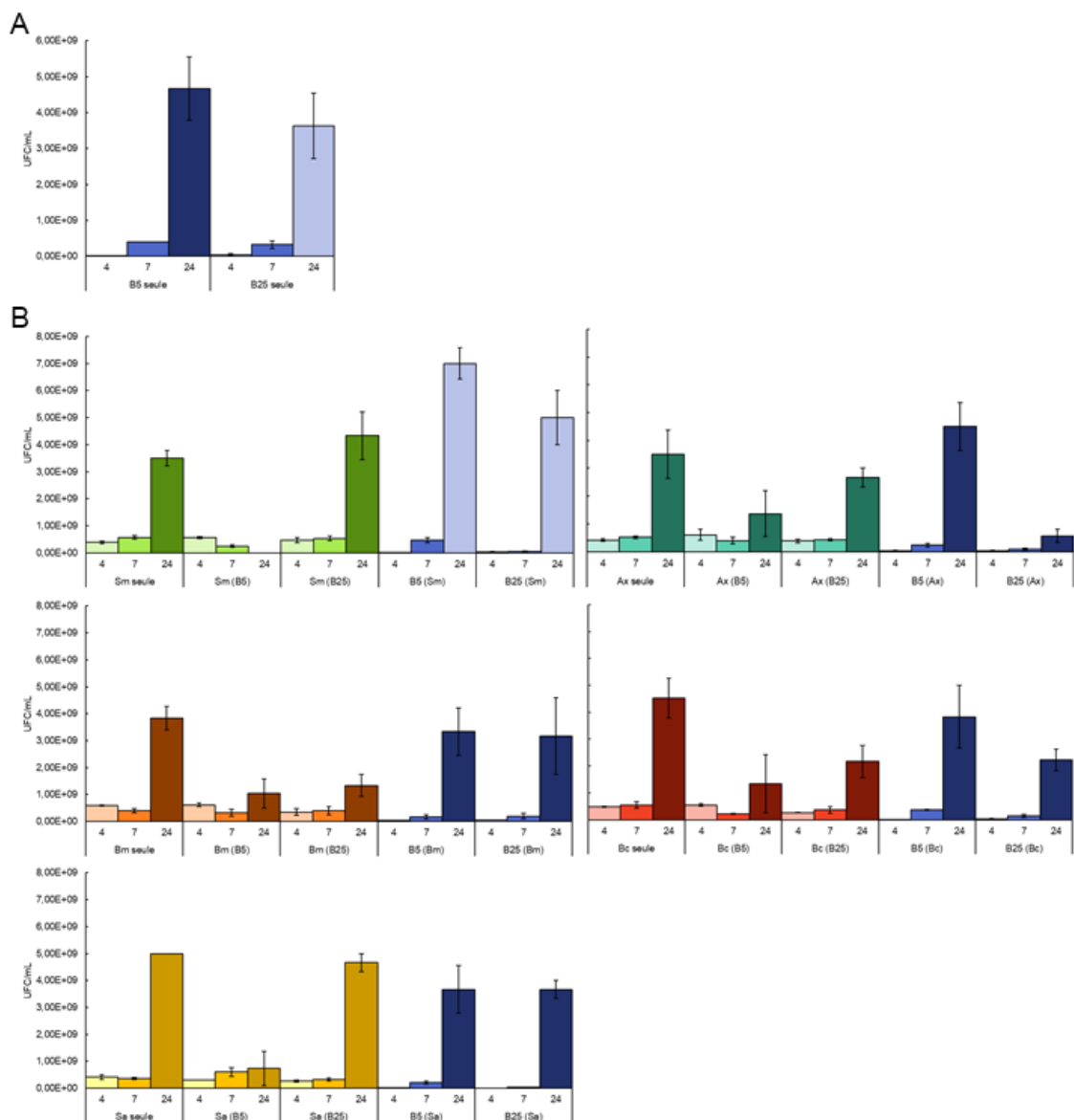


Figure 46 : Résultats des co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices au ratio 1-50. Les résultats ont été obtenus par dénombrement bactérien. A : résultats pour les isolats B5 et B25 seuls ; B : résultats pour les compétitrices seules et leurs mélanges. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n = 3).

Des résultats plus significatifs sont obtenus pour le ratio 1/50. La souche B5 inhibe fortement la croissance des souches Sm, Bc et Sa, moins rapidement celle de Bm (Figure 46). Même si Ax semble pouvoir utiliser les sidérophores de B5, cela ne lui permet pas de mieux se défendre contre cette dernière (Figures 45 et 46). Concernant la souche B25, tous les compétiteurs sont capables de pousser dans cet environnement (Figures 45 et 46). Seule la souche Ax prend le dessus sur Pa (Figure 46). C'est également la seule dont le surnageant inhibe la croissance de B25 (Figure

41). Quant aux bactéries compétitrices, elles poussent difficilement en présence de B5, mais mieux en présence de B25. Ax et Sa coexistent parfaitement avec B25 et ce sont également les seules dont le surnageant de Pa n'affecte pas fortement la croissance. Des corrélations peuvent ainsi être faites entre les résultats de co-culture et les résultats des surnageants compétiteurs. Si bien sûr d'autres facteurs peuvent se rajouter en co-cultures directes (SST6 par exemple), il faut surtout noter que la dynamique de croissance, de production des facteurs de virulence ne peut être approchée à travers les surnageants.

Au vu des résultats, une expérience capitale reste évidemment à réaliser : la délétion de gènes impliqués dans la production de PVD ou PCH dans la souche B5. Nous reproduirons ensuite les expériences présentées ici avec ces mutants, ce qui permettra d'affiner nos conclusions sur l'importance de ces deux sidérophores.

2.4. Lignes de discussions dégagées suite à ces résultats

Evolution de la production de sidérophores :

Le laboratoire de B. Tümmler a développé une bibliothèque de lignées de Pa au cours d'infections chroniques chez plus de 20 patients. Nous avons eu accès à certaines d'entre elles, qui présentaient un phénotype de PVD variable au cours du temps. Nous avons dans un premier temps voulu savoir si l'évolution de la production de PCH était parallèle à celle de la production de PVD. On observe cependant pour trois des lignées (B, E, K) une augmentation de la production de PCH au niveau de la souche 'intermédiaire'. Est-ce que cette production de PCH pourrait compenser la perte de production de PVD ? Est-ce que cette surproduction observée pourrait correspondre à l'apparition d'un plus grand nombre de '*cheaters*' décrit dans la séquence d'évolution de la production de PVD et donc à une nécessité pour la souche sauvage de s'appuyer sur un sidérophore différent ? Il faut aussi noter que dans le poumon les souches de Pa forment un ensemble hétérogène de variants et que l'isolat étudié n'est que l'un de ces variants et ne permet pas de conclusions sur l'ensemble de la population. Les sidérophores étant des molécules qui peuvent se partager, il est tout à fait possible que l'évolution génétique ne se fasse pas de la même manière pour tous les variants, alors même qu'une tendance à la baisse de production des deux sidérophores puissent être envisagée.

Il apparaît également que la PCH et la PVD aient des fonctions complémentaires et que la PCH n'est pas uniquement destinée à pallier l'absence de PVD lorsque la cellule n'a pas besoin de

dépenser beaucoup d'énergie à la synthèse de sidérophores. Ceci est vu à travers des exemples de la bibliographie, qui montrent un rôle de la PCH soit prépondérant dans la virulence comparée à la PVD (Britigan *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 2012b; Mould *et al.*, 2020). Dans notre étude, l'utilisation de PVD et PCH n'est pas la même en fonction des interactions considérées. Différents schémas peuvent être établis (Figure 47), en fonction des chélateurs de fer présents, établissant des synergies/compétitions/profits dans un seul sens. Ils ne permettent cependant pas encore de comprendre l'importance de ces interactions autour des sidérophores ; par exemple, Ax profite des deux sidérophores de Pa, mais aucun avantage n'apparaît pour Pa. De même, les avantages de Pa et Bc à partager un même sidérophore n'apparaissent pas clairement, d'autant que Pa inhibe fortement la croissance de Bc. Pa profite d'une source de fer de Sa, qui reste à identifier et qui induit une surproduction de PCH. Là aussi, est ce qu'il y a un retour direct ?

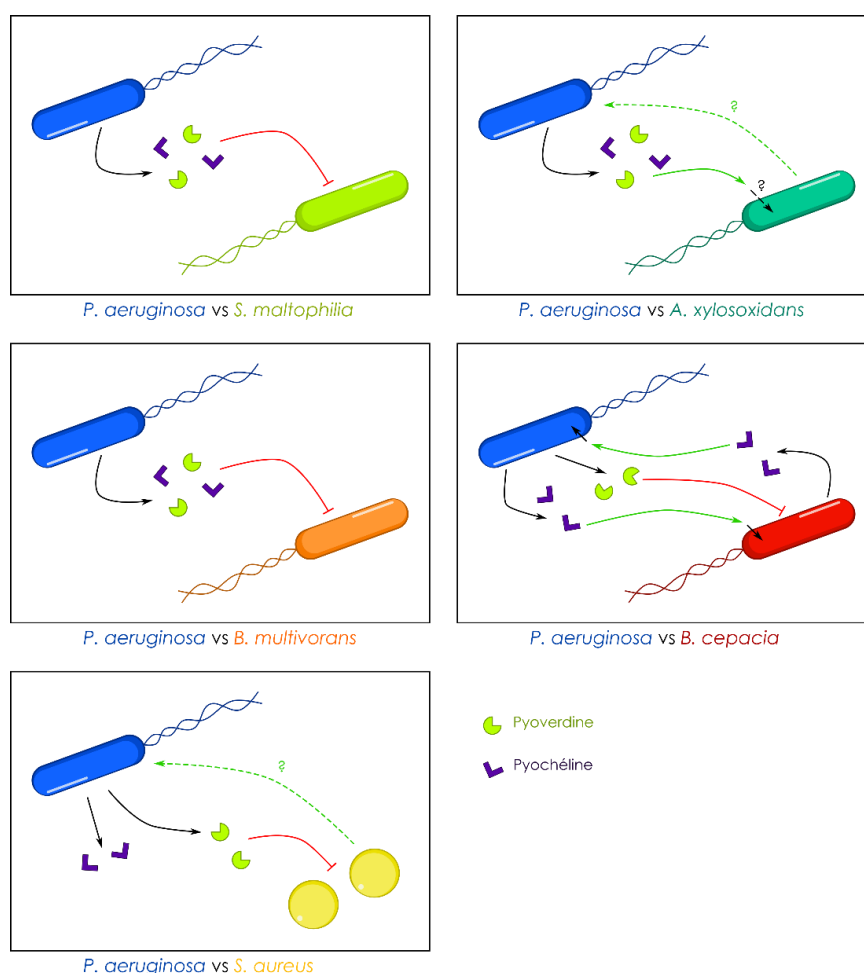


Figure 47 : Récapitulatif des effets des sidérophores de Pa sur les bactéries compétitrices. Les sidérophores de Pa inhibent la croissance de Sm et Bm mais stimulent la croissance d'Ax. La PVD inhibe la croissance de Bc et Sa. La PCH est partagée par Pa et Bc. Y-a-t-il des molécules impliquées dans la coopération d'Ax avec Pa ? A quoi peut-être dû l'effet positif de Sa sur l'isolat B25 au niveau de l'acquisition du fer ?

Importance des sidérophores :

Les deux sidérophores de Pa jouent un rôle important tant pour l'import en fer que comme facteurs de virulence. Néanmoins, il apparaît que la perte de production de ces deux sidérophores dans la souche B25 affecte bien plus la capacité du surnageant de Pa à inhiber la croissance de bactéries compétitrices que sa propre capacité à croître. Ceci est bien sûr à mettre en relation avec la capacité (faible) des compétiteurs à chélater le fer. Il faut également noter que Pa a développé toute une batterie de mécanismes pour utiliser les chélateurs exogènes (de l'hôte ou du microbiote environnant), qui lui permettent plus aisément de palier à l'absence de sidérophores. Il en résulte que la perte de production de sidérophores affecte bien plus la virulence de la souche de Pa que sa capacité à survivre. Par ailleurs, l'effet de Pa sur Sa dans nos conditions expérimentales, semble essentiellement reposer sur la production de sidérophores et plus particulièrement de PVD. Est-ce que cela peut se traduire par une plus grande facilité à interagir au cours de ces infections chroniques, car une telle interaction serait permise dès l'évolution de la production d'un seul facteur ?

Synergie croisée entre bactéries ?

Quel est l'intérêt pour Pa et Ax d'avoir cette interaction autour de la PVD et de la PCH ; surtout que cette coopération ne semble aller que dans un sens. Il est possible qu'une collaboration puisse effectivement s'établir, à travers d'autres facteurs/métabolites produits par l'une des bactéries. Ainsi Pa 'fournirait' des sidérophores tandis qu'Ax fournirait d'autres métabolites ; c'est l'une des raisons pour lesquelles nous envisageons l'analyse RMN des métabolites de co-cultures Pa-Ax. D'autres analyses seront peut-être nécessaires (protéome, excrétome...), qui seront envisagées dans un deuxième temps

Modulation du microbiote :

Le mutant B25 permet de plus nombreuses interactions bactériennes. L'apparition de ce mutant diminue la virulence de Pa envers l'hôte et le microbiote ambiant. On ne sait toujours pas si cette évolution vers une virulence diminuée est permise par l'état dégradé du poumon et du microbiote, ou au contraire si cette évolution permet une stabilisation de la colonisation chronique, en diminuant les réactions de l'hôte et/ou du microbiote envers Pa. Néanmoins, alors que cette évolution n'était essentiellement regardée qu'à travers les interactions hôte – pathogène, cette évolution permet aussi d'établir de nouvelles interactions bactériennes et pourrait de ce fait diriger

l'évolution du microbiote vers une nouvelle structuration. Il serait important d'étudier cette nouvelle structuration et son effet sur les fonctions pulmonaires. L'apparition de tels mutants au sein de l'ensemble hétérogène de variants Pa permet indirectement de diminuer la virulence de la bactérie, autant qu'elle favorise une diversité plus importante (et donc une capacité d'adaptation plus grande, comme l'a conclue l'étude portée par le laboratoire de B. Tümmler sur cette même collection de souches de Pa, étudiées dans ce cas pour leur capacité à pousser en co-culture intra-espèce ; différentes souches d'une même lignée mises ensemble, (Cramer *et al.*, 2020)). Il sera essentiel, pour mieux comprendre l'évolution de Pa ou de la production de ses sidérophores, d'inclure d'autres bactéries qui sont retrouvées dans le poumon à différents moments de l'infection, ou de complexifier l'étude par l'ajout de différentes bactéries (intra ou inter spécifiques) simultanément.

La délétion de gènes impliqués dans la production de PCH et/ou PVD dans la souche B5 sera nécessaire pour apporter des compléments à ces points.

3. Expérimentations complémentaires

3.1. Investigation de l'effet positif de la pyoverdine sur *A. xylosoxidans*

Ayant observé un effet positif des surnageants des isolats de Pa produisant de la PVD sur la croissance d'Ax, nous avons cherché à comprendre ce phénomène. Pour cela nous avons cultivé Ax en présence de PVD purifiée à différentes concentrations (Figure 48). La PVD est bien responsable de l'effet positif observé sur la croissance d'Ax, que les bactéries soient cultivées en MH chelex avec ou sans sérum. En absence de sérum et donc dans la condition la plus carencée en fer il est même possible d'observer un effet dose-dépendant. Ces résultats laissent supposer qu'Ax serait potentiellement capable d'utiliser la PVD pour l'acquisition du fer.

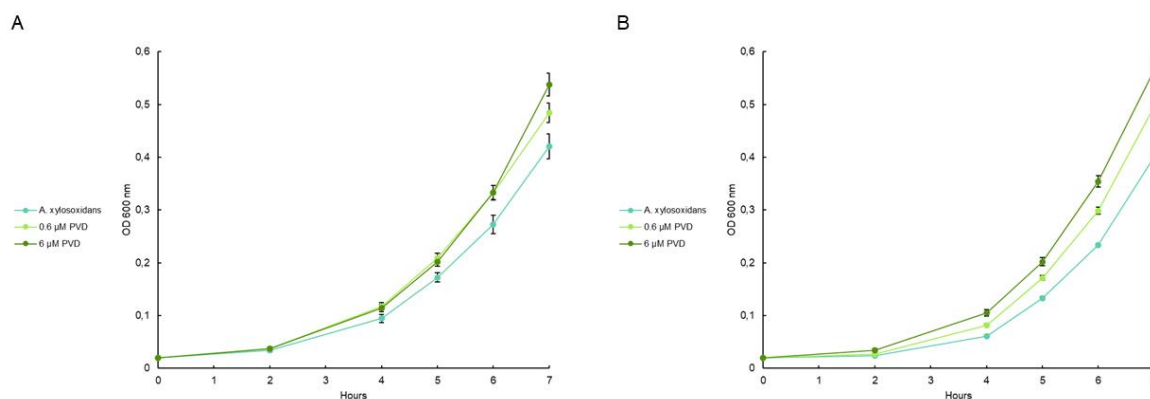


Figure 48 : Croissance d’Ax en présence de différentes concentrations de PVD. A : Avec 1 % de sérum dans le milieu de culture ; B : Sans sérum dans le milieu de culture. Les barres d’erreurs représentent l’erreur standard (n=3).

Pour aller plus loin dans cette hypothèse, nous avons fait des tests de compétition pour le fer entre la PVD et Ax. Pour cela nous avons utilisé la propriété de fluorescence de l’apoPVD. En effet, lorsque la PVD est libre, elle émet de la fluorescence, mais le complexe ferri-PVD lui, n’en émet pas. Il est donc possible de suivre la libération du fer du complexe ferri-PVD en observant une augmentation de la fluorescence et donc de l’apoPVD. Nous avons donc fait un suivi de croissance d’Ax en y ajoutant le complexe ferri-PVD (Figure 49). Cependant nous n’avons pas observé d’augmentation de la fluorescence. Cela ne signifie pas définitivement qu’Ax n’utilise pas le fer chélaté par la PVD. En effet, cette expérience fonctionne avec Pa car cette dernière recycle la PVD et donc de l’apoPVD se retrouve dans le milieu. Mais il se pourrait qu’Ax, lorsqu’elle récupère le fer de la PVD, la dégrade. Et si la PVD est dégradée, elle ne peut plus émettre de fluorescence. Cette expérience nous a cependant permis d’écarter l’hypothèse qu’Ax utiliserait la PVD avec recyclage, si elle est capable de l’utiliser.

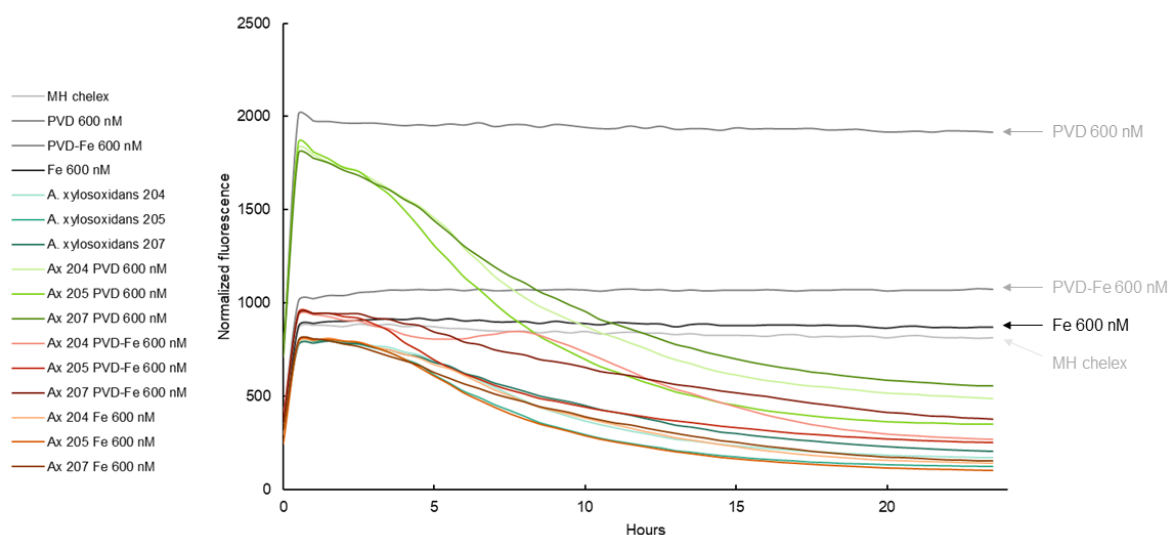


Figure 49 : Suivi de fluorescence de la PVD pendant la croissance d'Ax. L'expérience a été réalisée en répliquats biologiques (n=3).

Nous avons également cherché à savoir si des transporteurs de la PVD pouvaient potentiellement être présent sur le génome d'Ax. Pour cela nous avons procédé à un BLASTp de la séquence du transporteur de la PVD chez Pa, FpvA (Figure 50). De façon très surprenante, nous avons trouvé plusieurs gènes au sein des génomes disponibles pour le taxid Ax qui pourraient correspondre à un potentiel transporteur de la PVD. Parmi les protéines qui sont ressorties lors du BLASTp, une a retenu notre attention. Il s'agit d'une protéine annotée « TonB-dependent siderophore receptor » dont 95 % de la séquence ont 41 % d'homologie avec FpvA, ce qui est assez important pour une homologie de séquence protéique. Il y a également une autre protéine annotée comme étant un « Ferripyoverdine receptor precursor » qui possède les mêmes taux d'homologie. Il se pourrait donc qu'Ax possède bien un transporteur de la PVD.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	563	563	86%	0.0	43.92%	PTN51593.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	560	560	86%	0.0	43.64%	WP_088142503.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	559	559	95%	0.0	42.11%	WP_013395936.1
✓	MULTISPECIES: ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter]	558	558	96%	0.0	41.15%	WP_054415311.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	557	557	86%	0.0	43.22%	WP_013395985.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	556	556	96%	0.0	41.03%	WP_068980885.1
✓	MULTISPECIES: ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter]	552	552	96%	0.0	40.90%	WP_049075826.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	551	551	95%	0.0	42.31%	WP_088154509.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	549	549	95%	0.0	42.31%	WP_088142456.1
✓	TonB-dependent siderophore receptor [Achromobacter xylosoxidans]	546	546	95%	0.0	41.17%	AKP91814.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	531	531	96%	2e-177	40.30%	CUI51912.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	531	531	96%	2e-177	40.30%	CUI71525.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	531	531	96%	2e-177	40.30%	CUJ89868.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	531	531	96%	2e-177	40.30%	CUI64554.1
✓	ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE [Achromobacter xylosoxidans]	529	529	84%	3e-177	41.20%	WP_061070841.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	531	531	96%	3e-177	40.30%	CUR79702.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	530	530	96%	3e-177	40.30%	CUI42299.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	530	530	96%	4e-177	40.30%	CUI76014.1
✓	Ferripyoverdine receptor precursor [Achromobacter xylosoxidans]	530	530	96%	4e-177	40.30%	CKI10876.1

Figure 50 : BLASTp de FpvA dans le génome d’Ax. La séquence protéique de FpvA (PA2398) a été récupérée sur le site www.pseudomonas.com en utilisant le génome de la souche PAO1. Le BLASTp a été fait sur le site de BLAST du NCBI en utilisant l’ensemble des génomes disponibles pour Ax « *Achromobacter xylosoxidans* taxid ».

Cet ensemble de données laisse supposer qu’Ax serait effectivement capable de transporter la ferri-PVD afin d’en utiliser le fer. Il se pourrait que le complexe soit transporté dans la cellule, où la PVD est ensuite dégradée pour libération du fer, comme cela peut être le cas pour certains sidérophores chez d’autres bactéries. Il serait en tout cas très intéressant de poursuivre ces investigations.

3.2. Utilisation d’autres souches des bactéries compétitrices

Pour confirmer que les effets que nous observons entre Pa et les bactéries compétitrices ne sont pas souches-dépendants, mais espèce-dépendants, nous avons testé d’autres souches des espèces de bactéries compétitrices considérées. Nous disposons d’une souche supplémentaire de Sm ainsi que de deux souches additionnelles d’Ax et Bm. En revanche nous n’avons pas pu faire ces tests avec Bc et Sa pour lesquels nous n’avions qu’une seule souche.

Que ce soit l’effet du surnageant de ces autres souches de compétitrices sur Pa ou inversement, nous avons pu observer le même type de phénomènes qu’auparavant (Figures 51 et

52). Pour l'isolat B25 l'ajout de PVD permet toujours de restaurer la croissance de Pa. Bien que les croissances des bactéries compétitrices ne soient pas toujours les mêmes, les effets des surnageants de Pa vont dans le même sens que ce que nous avons observé précédemment. Cela nous a donc permis de confirmer que les effets obtenus ne sont pas souches-dépendants mais bien lié aux espèces étudiées.

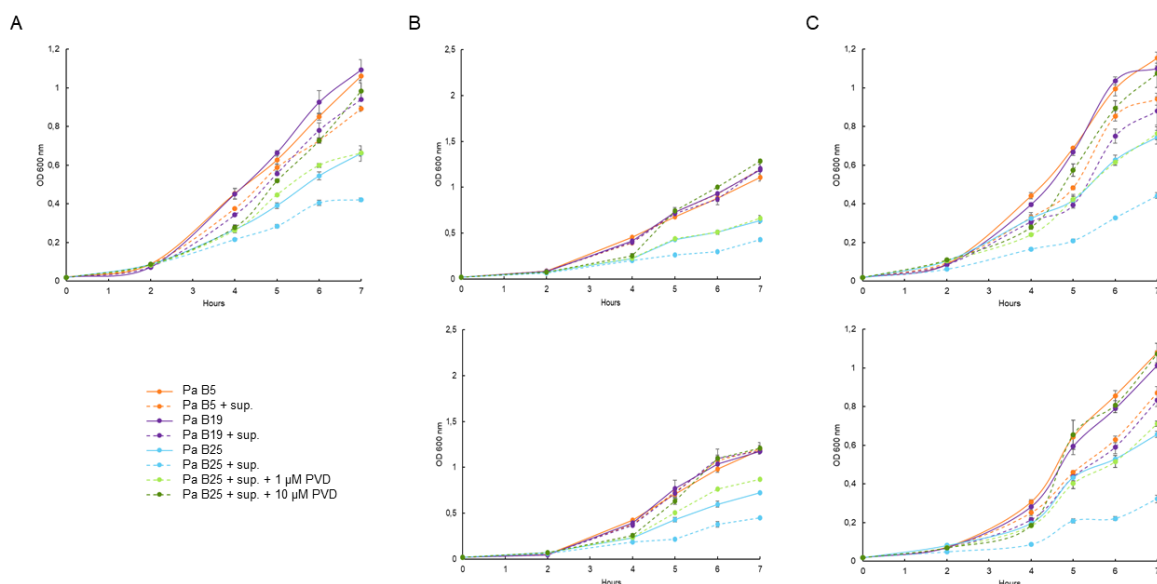


Figure 51 : Croissance de la lignée B de Pa en présence du surnageant d'autres souches des bactéries compétitrices étudiées. A : ajout du surnageant de Sm 196 ; B : ajout du surnageant de Ax 204 (haut) et 207 (bas) ; C : ajout du surnageant de Bm 200 (haut) et 202 (bas). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (n=3).

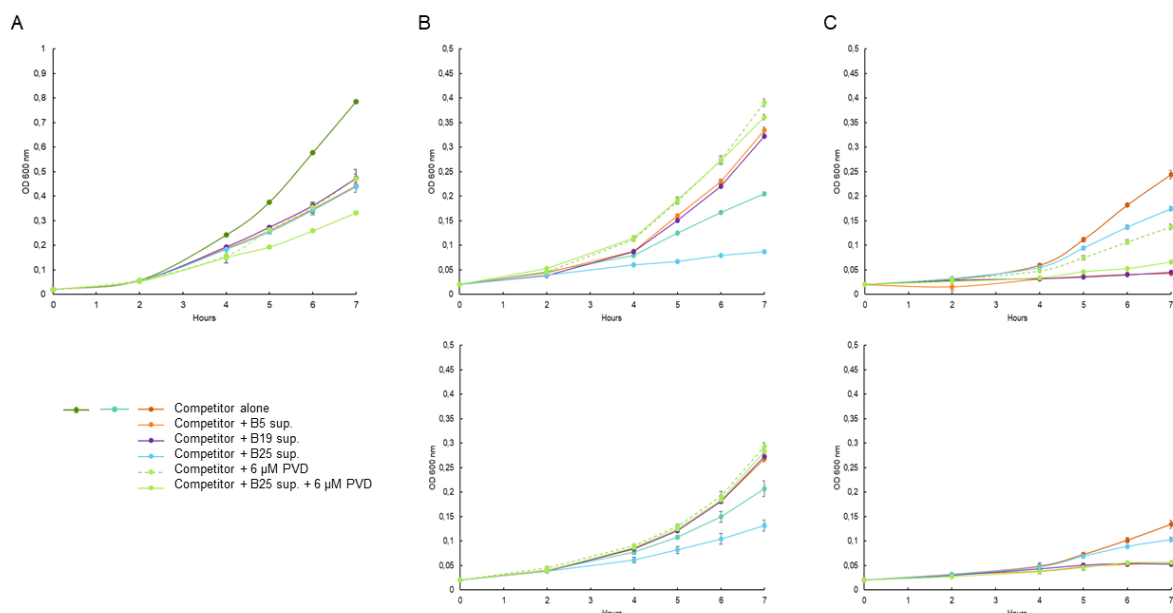


Figure 52 : Croissances d'autres souches des bactéries compétitrices en présence des surnageants de Pa. A : Sm 196 ; B : Ax 204 (haut) et 207 (bas) ; C : Bm 200 (haut) et 202 (bas). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=3).

3.3. Effet du surnageant de différentes lignées de Pa cliniques sur toute la collection de compétitrices

Dans le but d'augmenter la portée de notre étude nous avons commencé à étudier les interactions d'autres lignées de Pa cliniques de notre collection et d'ajouter également d'autres espèces de bactéries compétitrices. Pour pouvoir avoir un aperçu rapide de l'effet des surnageants des Pa cliniques nous avons choisi de faire les expériences en microplaque. Ces résultats ne sont donc pas tout à fait comparables à ceux réalisés en tubes car les conditions de cultures sont différentes mais cela nous permet d'avoir une vue d'ensemble rapide et de prévoir de grandes tendances. Nous avons ainsi également pu intégrer toute la diversité des espèces de bactéries compétitrices que nous possédons dans notre collection, ce qui nous a permis d'étudier les effets de Pa sur des bactéries très phylogénétiquement très différentes (Figure 53).

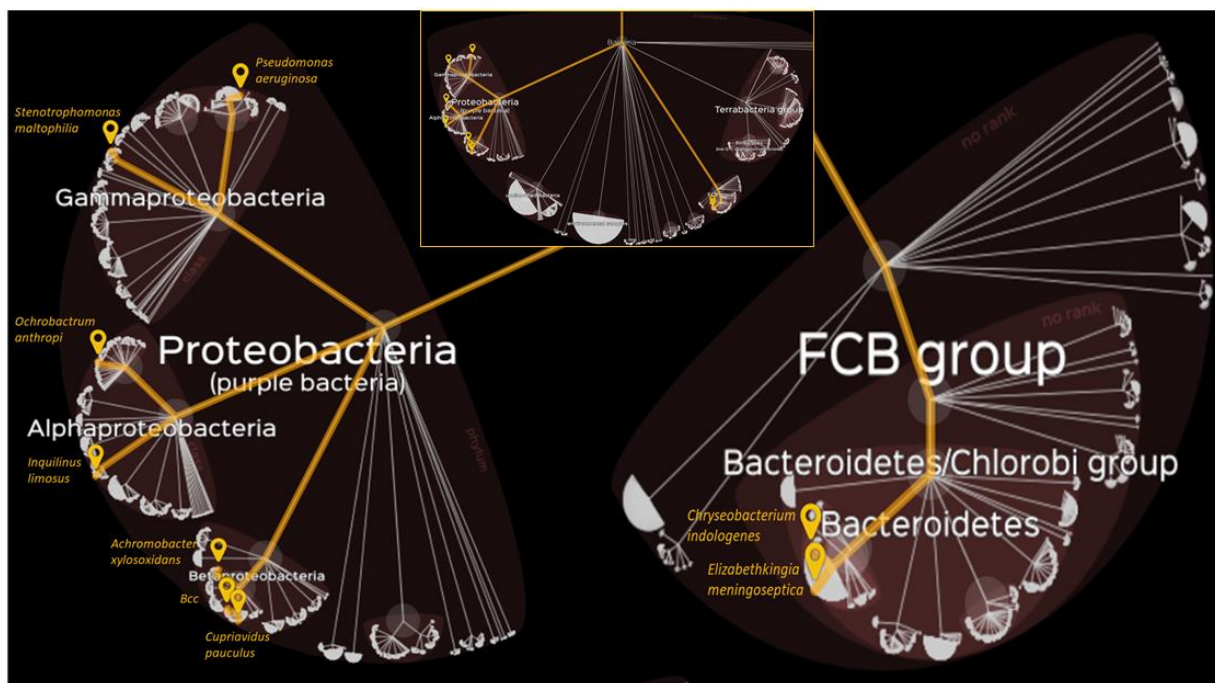


Figure 53 : Placement des différentes bactéries de la collection sur l'arbre phylogénétique du vivant. L'arbre a été obtenu à l'aide du site lifemap.univ-lyon1.fr utilisant les données taxonomiques du NCBI taxonomy.

Nous avons ainsi choisi d'évaluer l'effet du surnageant de deux autres lignées de Pa, les lignées E et F, sur la croissance des bactéries compétitrices. Du point de vue de la production de sidérophores, l'évolution de la production de PVD et PCH de ces deux lignées est comparable à celle de la lignée B. Plus on avance dans le temps de l'infection, moins il y a de PVD produite, les isolats E71 et F30 ne produisent plus de PVD et l'isolat F30 ne produit plus non plus de PCH (Figure 30).

Certains résultats obtenus en microplaques (Figure 54) sont donc différents de ceux en tubes, les cultures en microplaques s'apparentant plus à des cultures semi-anaérobies. Les lignées B et F induisent des effets similaires. Seules trois souches compétitrices ne sont pas sensibles au surnageant de Pa : Ax, *R. radiobacter* et *B. gladioli*. Une seule différence entre tubes et microplaques est à noter : Sm pousse en présence de surnageants de la lignée B mais pas F. Les isolats B25 et F30 perdent en virulence. Ces résultats seront également reproduits avec les mutants B5/B25 dans les voies de production de PVD ou PCH pour confirmer le rôle des sidérophores. Il ne semble en tout cas pas y avoir de lien entre l'effet des surnageants de Pa et la phylogénie : les espèces proches phylogénétiquement ne sont pas forcément celles pour lesquelles il y a le plus de compétition.

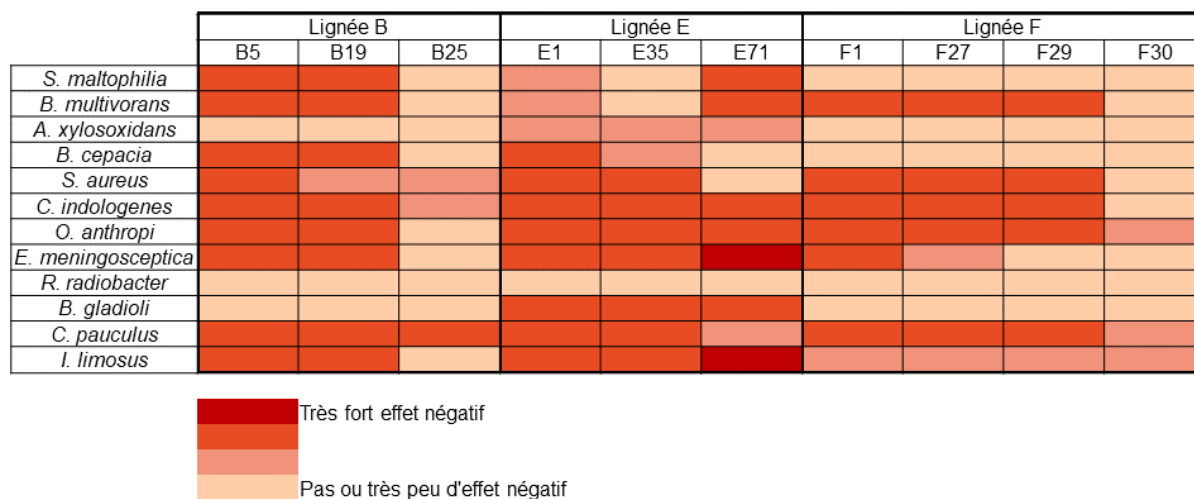


Figure 54 : Effet des surnageants de différentes lignées de *Pa* cliniques sur les bactéries compétitrices. L'échelle de couleur a été déterminée arbitrairement au vu de l'intensité des effets observés. Les résultats ont été obtenus en réplicats ($n = 3$).

Chapitre V

**Recherche d'un lien entre l'évolution de
la production de sidérophores et
l'augmentation de la résistance aux
antibiotiques durant l'infection
chronique**

1. Introduction

Lors des infections chroniques à *Pa*, les patients sont souvent traités aux ATB avec ce qu'on appelle un 'traitement de fond', c'est-à-dire des concentrations souvent sublétales d'ATB. Ces traitements de fond ont pour but d'empêcher la progression de l'infection, sans surdosage de médicament pour le patient, ce qui entraîne finalement une sélection des isolats plus résistants. Nous voulions examiner un lien possible entre résistance aux traitements de fond aux ATB, évolution des souches de *Pa* et leur statut de production de sidérophores. Pour cela nous avons co-cultivé une souche de laboratoire de *Pa* (PAO1 WT) et différents mutants de la voie des sidérophores (PAO1 Δ *pvdS* ne produisant plus de PVD, PAO1 Δ *fvpA* Δ *fvpB* ne pouvant plus importer la PVD, PAO1 Δ *pchR* ne produisant plus de PCH et PAO1 Δ *pvdS* Δ *pchR* ne produisant plus aucun sidérophore endogène) pouvant potentiellement être retrouvés dans les infections chroniques (Dingemans *et al.*, 2014; Winstanley *et al.*, 2016). Ces mutants montrent une sensibilité aux ATB similaire à la souche WT, mais leur viabilité sur une période longue n'a pas été testée, notamment en présence d'autres variants. Nous avons ainsi mis en présence différents mutants, sur une période relativement longue (10 jours), en comparaison aux expériences classiques sur 24/48 h, en ajoutant différentes concentrations d'ATB selon deux procédés expérimentaux. La souche PAO1 Δ *pvdS* ne produit plus PvdS, le régulateur principal de la voie PVD, ainsi que d'autres facteurs liés à la virulence de la souche. Ceci lui permet d'économiser la production de tout un ensemble de protéines, quelles que soient les conditions de cultures, mais cette souche ne produit plus de PVD. Comme ce mutant continue de produire en partie FpvA et FpvB (production néanmoins diminuée en qRT-PCR), dont les gènes sont sous le contrôle d'un autre régulateur (FpvI), il conserve donc sa capacité à importer la ferri-PVD produite par d'autres souches. Le mutant PAO1 Δ *fvpA* Δ *fvpB* quant à lui ne permet plus la production des transporteurs de la PVD, et donc ne permet plus l'import de ferri-PVD. Par contre, il produit encore de la PVD, bien que moins efficacement. PAO1 Δ *pchR*, quant à lui, ne produit plus de PCH et n'importe plus le complexe ferri-PCH₂. Les co-cultures WT/ Δ *pvdS* mettent ainsi en présence une souche WT avec une souche mutante qui économise de l'énergie sur la production de nombreuses protéines, tout en conservant en partie sa capacité à importer le fer via la PVD produite par la souche WT. C'est ce qu'on peut appeler une souche 'cheater'. Les co-cultures WT/ Δ *fvpA* Δ *fvpB* mettent en présence la souche WT avec une souche qui ne peut plus importer de ferri-PVD et dont l'import en fer dépend essentiellement d'autres voies comme la voie PCH, sidérophore moins affin pour le fer que la PVD.

2. Détermination des CMI

Pour démarrer cette étude et choisir nos conditions d'expérimentations nous avons commencé par déterminer les CMI des différents ATB pour les différentes souches utilisées. Déterminer les CMI nous permettait également de voir si en fonction des mutations nous observions une résistance différente aux ATB. Nous avons sélectionné 3 ATB pour cette étude : la tobramycine, un aminoside souvent utilisé dans le traitement des infections à Pa chez les personnes CF, l'ofloxacin, une fluoroquinolone, famille d'ATB ayant la particularité de chélater facilement les métaux dont le fer, et enfin la ticarcilline, un β -lactame qui est également utilisé pour traiter les infections à Pa.

Les CMI obtenues sont résumées dans le [Tableau 3](#). De façon globale aucune différence significative de la CMI n'est visible entre la souche PAO1 WT et les différents mutants (différence < 2). Il semble donc que de prime abord que des mutations dans les voies PVD et/ou PCH n'affectent pas la résistance à ces 3 ATB. Nous avons également pu mettre en évidence une forte résistance à la ticarcilline puisque pour toutes les souches la CMI est de 256 $\mu\text{g/mL}$. Cette résistance peut s'expliquer par la présence de la β -lactamase AmpC dans le génome de PAO1.

Tableau 3 : CMI pour différents ATB pour la souche PAO1 WT et ses différents mutants.
Les résultats ont été obtenus en réplicats biologiques (n = 3).

ATB	Souche	CMI (µg/mL)
Tobramycine	PAO1 WT	1
	PAO1Δ <i>pvdS</i>	0,5
	PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i>	0,5
	PAO1Δ <i>pcbR</i>	1
	PAO1Δ <i>pvdS</i> Δ <i>pcbR</i>	0,5
Ofloxacine	PAO1 WT	2
	PAO1Δ <i>pvdS</i>	1
	PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i>	2
	PAO1Δ <i>pcbR</i>	2
	PAO1Δ <i>pvdS</i> Δ <i>pcbR</i>	2
Ticarcilline	PAO1 WT	256
	PAO1Δ <i>pvdS</i>	256
	PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i>	256
	PAO1Δ <i>pcbR</i>	256
	PAO1Δ <i>pvdS</i> Δ <i>pcbR</i>	256

Pour nos expériences nous souhaitons nous placer à des concentrations sub-inhibitrices de ces différents ATB. Nous avons donc mesuré la DO₆₀₀ dans les puits de nos plaques de CMI afin de déterminer à quelle concentration était observée une inhibition de la moitié de la croissance des souches (CMI₅₀) (Figure 55). Nous avons choisi de déterminer la CMI₅₀ de cette façon et non par simple division de la CMI car l'effet des différentes concentrations en ATB n'est pas forcément linéaire.

Suite à cela nous avons choisi de travailler avec les concentrations en ATB suivantes : 0,5 µg/mL pour la tobramycine et l'ofloxacine ainsi que 16 µg/mL pour la ticarcilline.

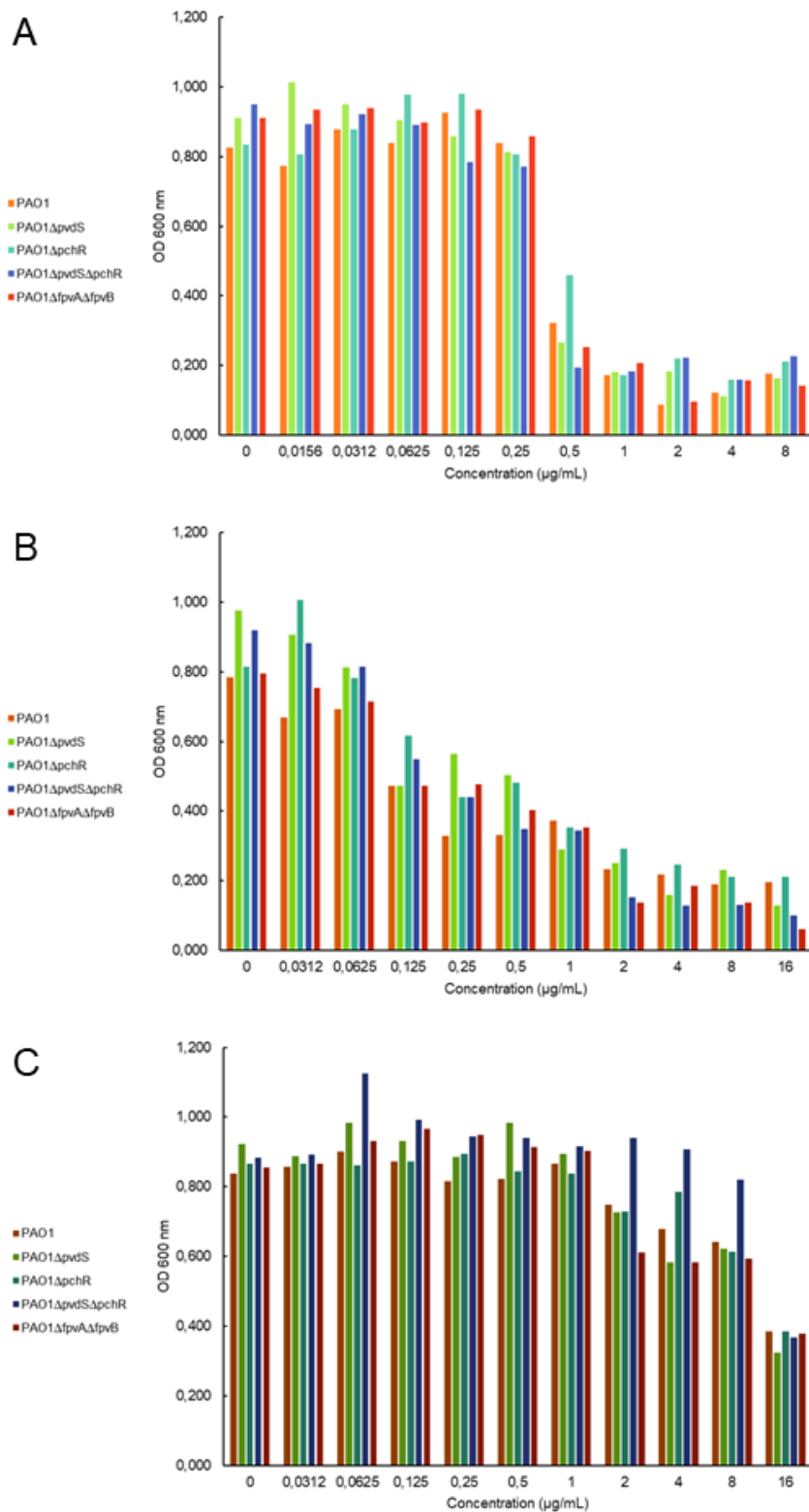


Figure 55 : DO₆₀₀ des différentes souches de PAO1 après 24 h de croissance en présence de différentes concentrations d'ATB. A : tobramycine ; B : ofloxacin ; C : ticarcilline. Les expériences ont été obtenues en réplicats (n = 3).

3. Co-cultures en présence d'antibiotiques

3.1. Co-cultures sur 10 jours en présence de concentration sub-inhibitrice d'antibiotiques

Une fois les conditions expérimentales déterminées, nous avons mis au point une expérience de co-culture en présence d'ATB sur 10 jours. Nous nous sommes inspirés des expériences d'évolution expérimentale, qui se déroulent sur le moyen-terme afin de voir des évolutions et adaptations plus profondes et donc de mettre en évidence un réel fitness des souches plutôt qu'une adaptation temporaire à une condition subie sur le court-terme. Pour plus de simplicité nous avons fait nos études en microplaque de façon à pouvoir tester de nombreuses conditions différentes. Nous avons également fait varier les ratios de départ entre les différentes souches. En effet, la quantité d'inoculum de départ peut avoir un impact important sur l'interaction entre les différentes souches. Comme il nous était impossible de différencier morphologiquement la souche sauvage des mutants à ce moment de la thèse nous avons estimé le ratio entre chaque souche à partir de la mesure de l'intensité relative des bandes obtenues sur gel d'agarose après amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*) sur le gène délété ou non (Figure 60). L'inconvénient de cette solution est que nous ne pouvions contrôler la quantité d'ADN testé lors des PCR et avons donc un biais dans nos expérimentations. Ces résultats préliminaires seront consolidés en utilisant la souche produisant de manière constitutive la protéine mCherry, construite plus tard dans l'avancement de ce projet (chapitre II des résultats). Par détection de la fluorescence, il sera alors possible de distinguer les deux souches après étalement sur boîte.

Dans un premier temps, nous avons pu voir que, quel que soit le ratio WT:mutant utilisé (1:1, 1:3, 3:1), nous obtenions les mêmes tendances dans les résultats. Nous avons également vite abandonné la condition avec ticarcilline. En effet, dans tous les cas il n'y avait plus de culture bactérienne au bout de 4 jours. Il semblerait donc que malgré la CMI élevée pour cet ATB et la présence de gènes de résistance contre les β -lactames dans le génome de PAO1, cet ATB ait un effet très néfaste sur le développement de Pa lorsqu'elle y est confrontée sur plusieurs jours, même en concentration sub-inhibitrice. Les résultats concernant le mutant $\Delta pchR$ n'ont montré aucune différence visible par rapport au WT ce qui nous a tout de même permis de montrer que la PCH ne semble pas jouer un rôle dans la réponse aux ATB (résultats non présentés).

En ce qui concerne les mutants de la voie PVD, nous avons pu observer deux types de comportements. Sans ATB ou en présence de tobramycine (Figure 56), le mutant $\Delta pvdS$ semble petit à petit dominer la souche WT (et ce malgré la légère différence de CMI, qui avait été

déterminée en plaque 96 puits, et qui apparaît bien non significative) (Figure 56 A). La souche $\Delta pvdS$ économise de l'énergie mais peut quand même importer le complexe ferri-PVD, ce qui lui confère un avantage de compétition sur la souche WT. Ces résultats restent similaires en présence de tobramycine, montrant que PvdS ne joue pas un rôle déterminant dans la résistance à cet ATB. Concernant le mutant $\Delta ffpA\Delta ffpB$, le ratio entre la souche sauvage et le mutant ne semble pas varier au cours du temps, en présence ou non de tobramycine (Figure 56 B). Ces résultats peuvent s'expliquer par la théorie des '*goods and cheaters*' comme décrite par Kümmerli et ses collègues (Kümmerli *et al.*, 2015b). Lors de l'évolution dans les poumons, toutes les bactéries ne vont pas évoluer dans la même direction. Seule une partie de la population va perdre la production de PVD par exemple. Mais ces dernières vont tout de même subsister et continuer à avoir un accès au fer facilité car bien qu'elles ne soient plus aptes à produire la PVD, dans le cas d'une délétion de *pvdS*, elles sont toujours capables de l'utiliser. Cela leur donne donc un avantage au niveau du fitness puisque ces dernières économisent le coût énergétique élevé qu'engendre la production de PVD. Pour ce qui est du mutant $\Delta ffpA\Delta ffpB$ il n'est plus capable d'utiliser la PVD, ce qui lui enlève cet avantage, mais il est toujours capable d'utiliser d'autres voies d'import du fer lui permettant de subsister même en présence du sauvage et/ou de tobramycine.

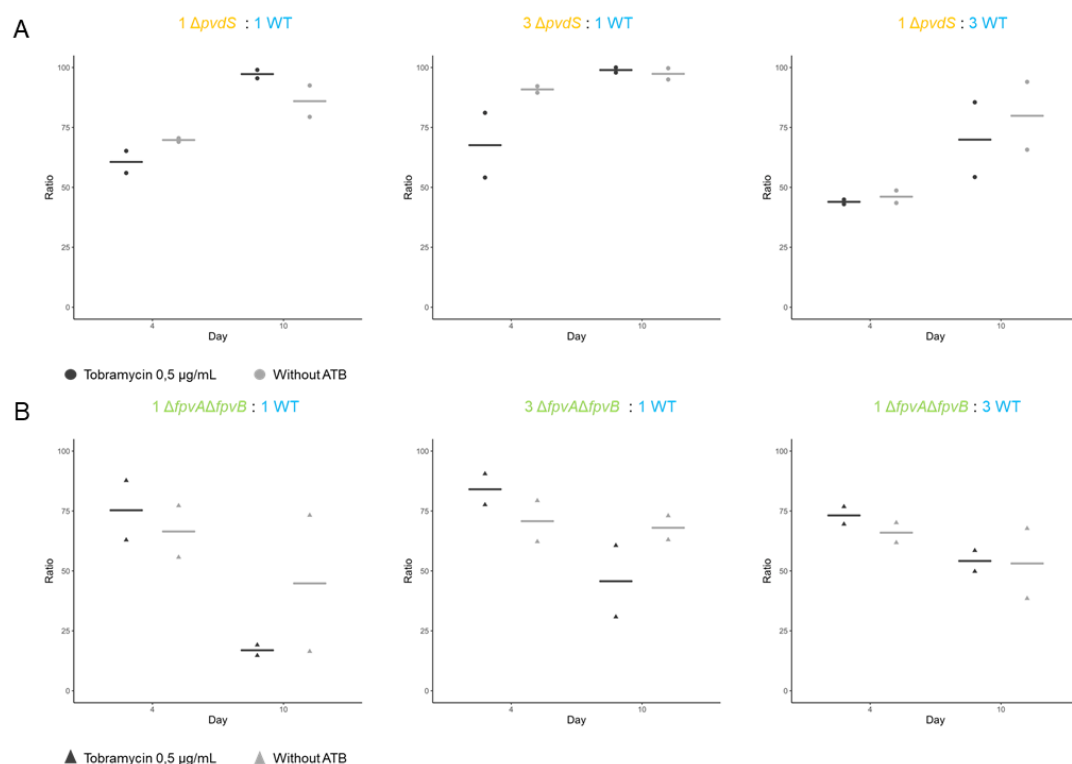


Figure 56 : Ratio de mutant par rapport au WT en présence ou non de tobramycine. A : co-culture PAO1 WT : PAO1 $\Delta pvdS$; **B :** co-culture PAO1 WT : PAO1 $\Delta ffpA\Delta ffpB$. Chaque point représente une expérimentation, la barre horizontale représente la moyenne (n=2).

En revanche en présence d'ofloxacine, le mutant $\Delta pvdS$ perd son avantage par rapport à la souche WT (Figure 57 A). Cette dernière résiste mieux à la présence d'ofloxacine et prend progressivement un avantage de croissance par rapport à ce mutant. Ces résultats sont encore plus flagrants avec la souche $\Delta fpvA\Delta fpvB$, qui ne subsiste quasiment plus après 10 jours en présence d'ofloxacine (alors que dans ce cas, aucune différence de CMI avec la souche WT n'avait été observée) (Figure 57 B). L'ofloxacine, comme toutes les fluoroquinolones, possède un groupement capable de chélater le fer (entre autres métaux). Le mutant $\Delta pvdS$ arrivait donc à survivre en utilisant la PVD produite par le WT. Quant au mutant $\Delta fpvA\Delta fpvB$, ne pouvant plus du tout utiliser la PVD, sa croissance est fortement compromise.

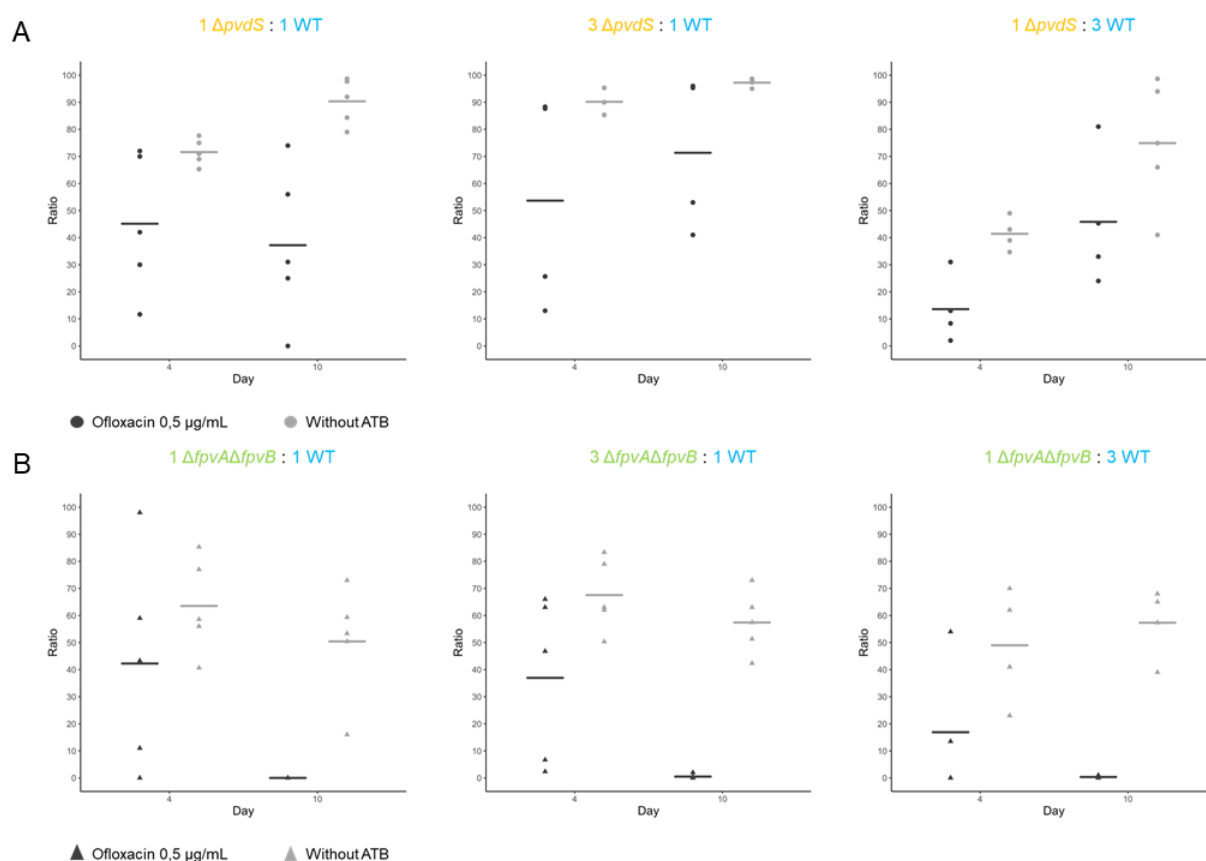


Figure 57 : Ratio de mutant par rapport au WT en présence ou non d'ofloxacine. A : co-culture PAO1 WT : PAO1 $\Delta pvdS$; B : co-culture PAO1 WT : PAO1 $\Delta fpvA\Delta fpvB$. Chaque point représente une expérimentation, la barre horizontale représente la moyenne (n = 5).

Ces résultats devront encore être étayés. Il faudra effectivement les reproduire avec la nouvelle souche WT productrice de mCherry, confirmer par RT-qPCR l'expression des différents facteurs de la voie PVD, et le pouvoir chélateur de l'ofloxacine. Ces résultats seront aussi reproduits

en présence de fer, pour contrer sa chélation par l'ofloxacine, ou en présence d'un autre chélateur de fer qui n'a pas d'activité ATB aux doses utilisées.

Si ces résultats peuvent être le fait d'une meilleure absorption du fer par la souche WT, ils peuvent aussi être le fait d'une évolution de la souche après quelques jours de culture, évolution qui serait plus efficace/rapide pour le WT que pour les mutants. Nous avons mesuré la CMI des co-cultures après 10 jours, et n'avons pas observé de différence importante de résistance avec les souches d'origine.

Comme précisé en introduction, de nombreux variants de Pa sont présents dans le poumon de patients CF (dont certains produisent peu de sidérophores, ou ne produisent plus les transporteurs, (Cornelis and Dingemans, 2013b)). Il est ainsi possible que la nature de l'ATB puisse influencer sur la sélection des variants de Pa qui vont subsister après le traitement, et que cette sélection se fasse au profit de clones dont la voie PVD est active. Nos expériences ont été réalisées en présence de concentration subléthales d'ATB, qui n'ont pas provoqué l'apparition de mutants résistants. Mais il est tout à fait possible que ce même schéma puisse se reproduire à d'autres concentrations d'ATB, plus fortes, contribuant à l'apparition de variants résistants aux ATB, et présentant une voie PVD active. C'est ce que nous avons testé dans l'approche suivante.

3.2. Utilisation du gradient de Szybalski

Pour aller plus loin dans cette étude, nous avons décidé d'utiliser la méthode du « gradient de Szybalski ». Cette méthode, mise au point par Szybalski et Bryson leur permettait de sélectionner des colonies plus résistantes aux ATB que la moyenne de la population de la souche (Szybalski and Bryson, 1952a). L'objectif de l'utilisation de cette technique était de voir, dans le cas de nos mélanges PAO1 WT/mutant, à quelle souche appartenaient les colonies se développant le plus loin dans le gradient d'ATB. Pour évaluer cela, toutes les colonies isolées se démarquant du tapis bactérien ont été testées par PCR sur le gène variant entre le WT et le mutant afin d'identifier à quelle souche elles appartenaient. Les boîtes ont ainsi été incubées durant 6 jours, pour observer l'apparition de mutants.

Dans le cas de la tobramycine, après 6 jours d'incubation des boîtes, lorsque sont mélangés PAO1 WT et chaque mutant, 42 % des colonies se démarquant du tapis sont des colonies de mutants dans le cas de PAO1 Δ *pvdS* (Figure 58 A) et 32 % sont des colonies de mutants dans le cas

de PAO1 Δ *fpvA* Δ *fpvB* (Figure 58 B). L'import de fer semble bien jouer un rôle favorable dans l'apparition de clones résistants.

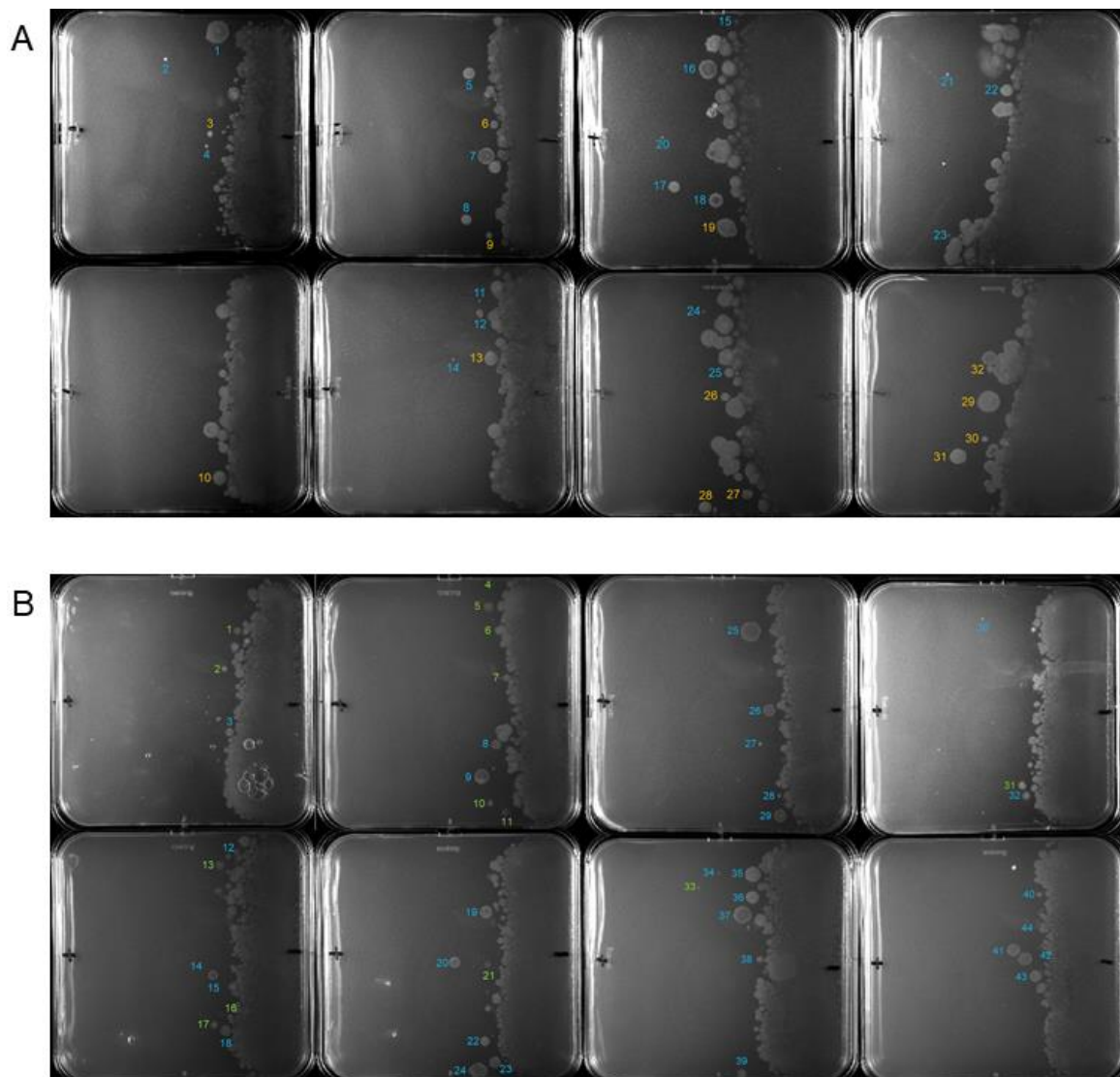


Figure 58 : Boîtes de gradient de Szybalski avec tobramycine. Les boîtes sont présentées de la concentration la plus forte à gauche (correspondant à la CMI des souches) vers la concentration la plus faible à droite. Chaque boîte représente un réplicat biologique (n = 8) et environ une quarantaine de colonies isolées ont été testées pour chaque condition. A : mélange entre PAO1 WT (bleu) et Δ *fpvS* (jaune) ; B : mélange entre PAO1 WT (bleu) et Δ *fpvA* Δ *fpvB* (vert).

Pour l'ofloxacine, les clones résistants issus de la souche sauvage sont encore plus majoritaires, nous observons ainsi une tendance similaire à ce qui a été observé en co-cultures liquides. Effectivement, après 6 jours d'incubation, 27 % des colonies testées sont des mutants

dans le cas du mutant $\Delta pvdS$ (Figure 59 A) et seulement 11 % dans le cas du mutant $\Delta fpvA\Delta fpvB$ (Figure 59 B). Il nous reste encore à tester la CMI de ces différents variants.

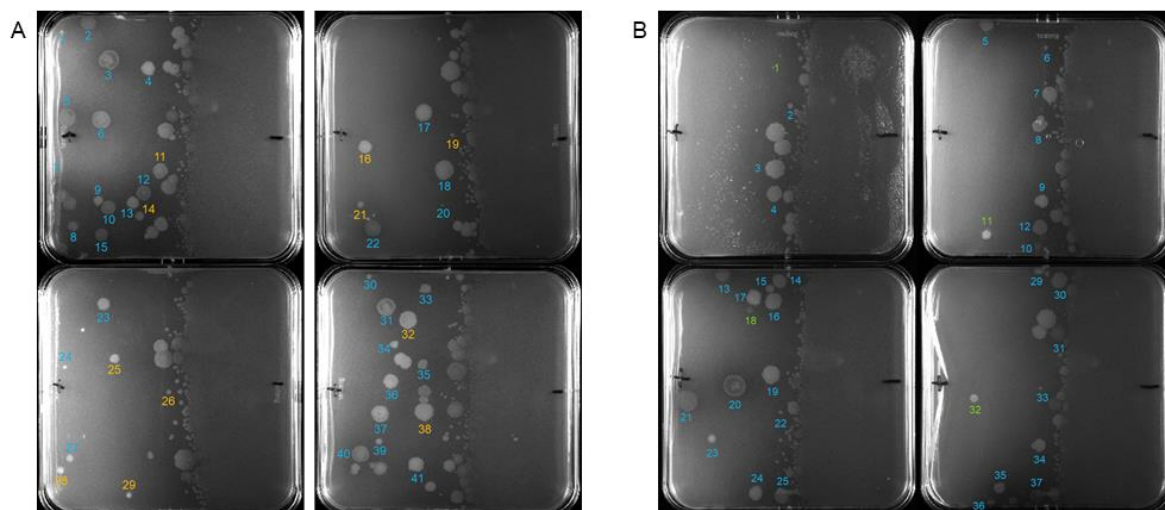


Figure 59 : Boîtes de gradient de Szybalski avec ofloxacin. Les boîtes sont présentées de la concentration la plus forte à gauche (correspondant à la CMI des souches) vers la concentration la plus faible à droite. Chaque boîte représente un réplicat biologique ($n = 4$) et environ une quarantaine de colonies isolées ont été testées pour chaque condition. A : mélange entre PAO1 WT (bleu) et $\Delta pvdS$ (jaune) ; B : mélange entre PAO1 WT (bleu) et $\Delta fpvA\Delta fpvB$ (vert).

Ces résultats vont donc globalement dans le même sens que les résultats obtenus en co-cultures liquides. Cependant, de façon générale, les ratios de mutants sont plus faibles. Cela peut s'expliquer par le fait que les colonies isolées le sont à des quantités d'ATB plus fortes sur le milieu solide. De plus, il a été montré que la susceptibilité aux ATB est différente si les bactéries sont cultivées en milieu liquide ou solide (Luber *et al.*, 2003; Flanagan and Steck, 2017).

Ces résultats sont préliminaires, et devront bien sûr encore être consolidés pour bien comprendre l'implication des voies d'import du fer dans la résistance/sensibilité aux ATB. Nous pouvons cependant en faire émerger certaines hypothèses. Lors de la colonisation chronique de patient CF à Pa, différents variants apparaissent, dont certains sont caractérisés par une production de sidérophores diminuées. Il est admis qu'un des moteurs de la sélection de ces variants est une économie d'énergie car le fer peut être importé via d'autres voies dans ces conditions d'infection (hèmes, transferrine...). Nous montrons que d'autres facteurs vont contribuer à la sélection (ou non) de tels variants, comme la nature de l'ATB utilisé. L'apparition de tels variants est ainsi bien plus complexe et probablement soumise à de nombreuses pressions de sélection différentes.

Partie III

Discussion et conclusion

Discussion et conclusions

Dans les infections, le fer tient une place importante. Élément essentiel à la vie, il est tout aussi important pour l'hôte, que pour les pathogènes. Cependant le fer est un élément très peu biodisponible et devient toxique à trop forte concentration. Dans l'hôte, l'accès au fer est donc très limité. D'une part car libre, le fer précipite et peut être dangereux, mais également pour rendre difficile son accès aux pathogènes et donc limiter les infections. Mais les pathogènes, et en particulier les bactéries, ont développé des stratégies d'acquisition du fer contournant ces défenses, dont l'une des armes les plus efficaces est l'utilisation des sidérophores.

Pa est une bactérie pathogène particulièrement bien équipée pour acquérir le fer en contexte infectieux. Elle possède de nombreux systèmes d'acquisition, dont deux sidérophores, la PVD et la PCH. La PVD est un sidérophore très efficace dont la voie et la régulation sont très bien décrites et le rôle dans la virulence de *Pa* reconnu et démontré. La PCH a quant à elle longtemps été considérée comme le sidérophore 'secondaire' de *Pa*. Son rôle serait de palier à la PVD lorsque cette dernière ne serait plus fonctionnelle ou exprimée. Sa voie et sa régulation sont bien documentées mais il reste de nombreuses zones d'ombres et son rôle dans la virulence n'a jusqu'alors jamais vraiment été mis en avant.

Chez les patients CF, *Pa* est un réel problème puisque lorsqu'elle infecte les poumons de ces personnes, elle est très difficile à éliminer, finit par coloniser les poumons chroniquement et entraîne des dommages diminuant fortement la capacité respiratoire, pouvant entraîner jusqu'à la mort. Lors de ces infections devenues chroniques, *Pa* évolue pour s'adapter à l'environnement pulmonaire et échapper plus facilement au système immunitaire. L'un des changements souvent observés est la diminution, voir la perte totale de la production des sidérophores. Ces souches ont alors une physiologie très différente et une virulence diminuée. Lors de ces colonisations chroniques, il n'est pas rare de voir apparaître des co-colonisations avec d'autres microorganismes, en particulier d'autres bactéries pathogènes telles que les membres du Bcc ou des pathogènes émergents comme *Sm* ou *Ax*.

L'objectif de ce projet était de mieux déterminer le rôle que jouent les sidérophores et l'évolution de leur production dans les infections chroniques à *Pa* chez les patients CF. Tenter d'affiner encore nos connaissances sur la voie PCH et plus particulièrement sa régulation mais également mieux déterminer son rôle dans l'infection et les interactions. Quel est le rôle de la PVD

et de la PCH dans les interactions de Pa avec les autres bactéries pathogènes ? Et enfin, l'évolution de leur production impacte-t-elle l'ATB-résistance de Pa ou inversement ?

Pour élucider plus en détail la régulation de la voie PCH nous avons combiné différentes approches de biologie moléculaire comme l'utilisation de gènes rapporteurs permettant le suivi de l'expression des gènes de la voie dans différents mutants ou de la protéomique, combiné à l'utilisation de techniques telles que la protéomique. Ces études nous ont permis de mettre en avant que même dans un mutant ne produisant pas de PCH, nécessaire pour la boucle d'auto-activation, les gènes de la voie étaient exprimés grâce au régulateur PchR, nous amenant à la conclusion que tout comme pour la PVD, il existe dans la voie PCH une 'fuite' d'expression de PchR. Cette fuite permet l'expression de la voie mais n'est visible qu'en conditions de fort stress. De plus, la production de PCH est augmentée en présence de chélateurs de fer dans un contexte où la bactérie n'est plus capable de produire de PVD. Cela laisse suggérer que la PCH, bien qu'inhibée dans ces conditions chez une souche sauvage, est capable de prendre le relais lorsque la PVD n'est plus exprimée, ce qui peut être le cas lors de l'évolution durant une colonisation chronique des poumons. Dans un tel contexte, la bactérie semble capable de forcer la production de PCH. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que la régulation de la voie PCH est bien plus complexe que ce qui était déjà connu et que son utilité dans l'infection pourrait être bien plus importante que ce qui a été décrit jusqu'à aujourd'hui.

Nous avons également approfondi nos connaissances sur le rôle des sidérophores dans les interactions avec les autres bactéries pathogènes. Pour ce faire, nous avons créé un nouvel outil permettant le suivi de croissance Pa en présence d'autres bactéries, sans avoir recours à des plasmides où l'utilisation d'ATB et le nombre de copies peuvent poser un problème. Nous avons réussi à intégrer directement dans le chromosome un tag fluorescent, soumis à une expression constitutive, sans altérer l'expression des gènes avoisinants ni la physiologie de la cellule. En faisant cela directement dans des isolats cliniques, nous avons pu faire des co-cultures directement entre isolats cliniques comme pour le reste de notre étude. La mise au point de cette méthode a été un travail particulièrement long et fastidieux puisqu'il n'a finalement été fonctionnel qu'au bout d'environ deux ans d'essais après avoir été entrepris et construit dans les mains de deux personnes. Pour construire ces mutants, nous avons choisi d'utiliser la méthode de conjugaison pour le transfert du plasmide et la méthode de double recombinaison homologue pour l'intégration dans le chromosome. Ce sont deux méthodes que nous maîtrisons particulièrement bien au laboratoire et qui nous ont permis d'obtenir une banque conséquente de mutants chez la souche PAO1 auparavant. L'utiliser chez des isolats cliniques de Pa fut un défi supplémentaire, notamment dû à la plus forte résistance aux ATB de ces souches et une physiologie différente. Bien que nous n'ayons

pas réussi à corrélérer la quantité de fluorescence du tag avec l'absorbance à DO₆₀₀ de nos bactéries, ces mutants nous permettent tout de même de faire des co-cultures sans avoir recours à l'utilisation de plasmide, et donc d'ATB pour la sélection, mais également de ne pas avoir à utiliser de milieu spécifique pour les dénombrements bactériens de chaque espèce du mélange. En effet, ces mutants nous permettent d'observer la croissance par dénombrement de nos deux espèces sur des boîtes de milieu classique, les colonies étant toujours différenciables, même en utilisant une méthode d'étalement en goutte, ce qui nous a permis de gagner un temps de manipulation et de simplifier grandement la logistique de ce genre d'étude. Enfin, cet outil est très intéressant car le tag fluorescent est remplaçable par n'importe quel gène d'intérêt et ouvre donc la porte à une multitude de possibilités.

Pour mieux caractériser le rôle des sidérophores et l'évolution de leur production dans les interactions avec d'autres pathogènes bactériens, nous avons utilisé une collection d'isolats cliniques de Pa provenant d'expectorations de patients Cf colonisés de façon chroniques dont les échantillons ont été prélevés au cours du temps. Cette précieuse collection nous a permis de suivre l'évolution, et ce, chez différents patients dont les lignées de Pa n'évoluent pas toujours dans la même direction. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le schéma 'classique' de perte de l'expression des sidérophores n'était pas toujours ce qui était observable. Bien que plusieurs de nos lignées de Pa semblent suivre ce schéma d'évolution, chez d'autres aucune modification de l'expression des sidérophores ou alors une réapparition de leur expression était visible.

En cultivant ces isolats en présence des surnageants de bactéries compétitrices nous avons pu mettre en évidence le rôle non négligeable des sidérophores de Pa dans son acquisition du fer, en présence des sécrétomes d'autres pathogènes. La PVD en particulier, permet de restaurer la croissance et de résister à la présence des molécules sécrétées par les compétitrices. Même chez une souche ne produisant pas de PVD, son apport est un réel atout pour la croissance.

En cultivant des bactéries compétitrices en présence du surnageant de ces isolats nous avons également pu mettre en évidence le rôle non négligeable de la PVD dans l'interaction avec les autres bactéries, mais également celui de la PCH. De prime abord nous pensions que les sidérophores auraient uniquement un rôle de virulence et donc dans la compétition avec les autres bactéries pathogènes. C'est ce qui est majoritairement le cas, notamment avec des bactéries physiologiquement proches de Pa, telles que Sm, Bm ou Bc (qui étaient avant classées parmi les *Pseudomonas*) mais également avec des bactéries très éloignées telles que Sa. Dans le cas de cette dernière la PVD semble jouer à elle seule le rôle dans l'effet observé. En revanche dans les autres cas, elle n'explique bien souvent qu'une partie de l'effet. Nous avons également pu mettre en avant

que la PCH était elle aussi impliquée dans les interactions avec les autres bactéries. Parfois, de façon positive, puisque d'autres espèces bactériennes comme Bc sont également des productrices et donc utilisatrices de ce sidérophore, mais d'autres fois de façon négative comme cela pourrait être le cas avec Sm par exemple. De façon très surprenante, nous avons pu voir un effet positif du surnageant de Pa sur Ax, et ce uniquement lorsque des sidérophores sont présents dans le surnageant. Nous avons cherché à investiguer plus en détail cette piste. Bien que nous n'ayons pas été capables de démontrer si Ax peut utiliser la PVD, des pistes encourageantes allant dans cette voie mériteraient d'aller plus loin. En effet, Ax possède dans son génome un gène ayant des similarités avec le transporteur FpvA de Pa et l'ajout de PVD a un effet dose-dépendant sur sa croissance. Peu de choses sont connues sur l'homéostasie du fer de cette bactérie et il serait très intéressant de l'approfondir.

L'utilisation des surnageants pour cette partie de l'étude nous a permis de nous concentrer sur le rôle que jouent les sidérophores dans les interactions. Nous sommes cependant conscients que bien d'autres molécules jouent un rôle et que certaines ne sont exprimées qu'en présence d'autres bactéries en fonction du QS. De plus, le contact reste un paramètre non négligeable des interactions, bien que le poumon est un environnement complexe comprenant de nombreuses niches et donc les bactéries ne se retrouvant pas toujours au même endroit. Grâce à nos mutants d'isolats cliniques possédant un tag fluorescent nous avons ensuite pu aller plus loin dans cette étude en observant les interactions directes entre les isolats cliniques de Pa et les compétitrices. Nous avons obtenu des résultats plus tranchés avec ces premières études de co-culture. Nous avons dans un premier temps utilisé un isolat de Pa produisant des sidérophores et un isolat n'en produisant plus. Ces deux isolats sont également très différents de manière globale avec un protéome modifié et une virulence atténuée chez l'isolat ne produisant plus de sidérophores. En utilisant un ratio d'inoculation de 1 Pa : 1 compétitrice nous avons observé dans tous les cas, que ce soit avec la souche produisant des sidérophores ou non, que Pa prend le dessus. Cependant, avec la souche ne produisant plus de sidérophores les compétitrices arrivent un peu mieux à survivre. Ces études de co-culture directe n'en sont qu'à leur début et il serait très intéressant de les poursuivre en utilisant différents ratios Pa : compétitrice pour voir si cela peut influencer les interactions.

Au-delà des sidérophores nous avons commencé à étudier les nutriments consommés par les différentes bactéries dans le milieu de culture. Au-delà du fer, les bactéries sont surement en compétition pour l'acquisition des nutriments et nous nous demandons si les bactéries proches physiologiquement et ayant une interaction plutôt de type compétitif ne sont pas en guerre pour l'acquisition des nutriments. Pour cela nous avons commencé des analyses de RMN sur le

surnaissant de culture de nos différentes bactéries seules, mais également en co-culture. Malheureusement ces résultats ne sont pas assez aboutis pour être présentés dans ce manuscrit mais font une belle ouverture à la suite de ce projet.

Enfin, nous avons également cherché à déterminer si un lien était possible entre l'évolution de l'expression des voies sidérophores et l'évolution de la résistance aux ATB durant les infections chroniques à Pa. Pour cela nous avons adopté une démarche en nous inspirant des expériences d'évolution expérimentale. Nous avons mis différents mutants des voies sidérophores de PAO1 en présence de concentrations sub-inhibitrices d'ATB, comme cela pourrait être le cas dans les infections chroniques en essayant de faire des cultures sur le moyen terme, à savoir une dizaine de jours. Ne possédant alors pas les mutants marqués chromosomiquement, il était difficile de suivre régulièrement la croissance d'un mélange de souches dont la seule différence était la délétion ou non d'un seul gène. Pour pallier à cela nous avons mis au point une méthode assez exotique en mesurant l'intensité des bandes PCR obtenues pour chaque mutant dans le mélange et en rapportant cela à un ratio en pourcentage. Nous avons cependant pu montrer que notre méthode semble répétable et qu'en fonction des répliques de nos expériences les mêmes tendances ressortent dans nos résultats et avons pu confirmer cela par une autre méthode. Nous avons pu observer des résultats intéressants en présence d'ofloxacine où la souche sauvage semble mieux survivre que le mutant délété de *pvdS*. Alors que sans ATB, le mutant se développe mieux car il a un avantage de fitness puisqu'il peut utiliser la PVD produite par la souche sauvage sans avoir à déboursier d'énergie pour sa synthèse. Cette différence de résultats entre la condition avec/sans ofloxacine peut s'expliquer par le fait que les fluoroquinolones sont des molécules capables de chélater le fer. L'effet observé serait donc dû à un manque de disponibilité du fer plutôt qu'à l'ATB lui-même. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence un lien entre l'évolution de la voie PVD et l'augmentation de la résistance aux ATB, tout du moins dans le cas des ATB testés dans cette étude. Il faudrait cependant confirmer ces résultats en refaisant les expériences à l'aide de nos mutants tagués maintenant que nous avons réussi à les créer.

Ce projet a été permis par l'ensemble des connaissances acquises notamment au laboratoire sur les mécanismes d'import du fer et sur leurs voies de régulation chez Pa. Il nous a semblé possible d'entamer des études sur l'importance des voies d'import du fer dans des contextes plus complexes, autant concernant le milieu que les souches utilisées. Les deux sidérophores peuvent jouer des rôles similaires, complémentaires ou opposés vis-à-vis des bactéries environnantes (intra ou inter spécifique). Ils peuvent être importants pour la compétition entre deux bactéries pour l'import du fer, ou permettre des synergies. L'évolution de la production des sidérophores n'est pas non plus identique pour la PVD et la PCH, ce qui peut refléter un intérêt et rôle différent.

L'évolution de leur production, si elle est permise par la présence de chélateurs de l'hôte que Pa peut utiliser, va également dépendre des interactions au sein du microbiote, de l'ajout d'antibiotiques par exemple.

L'apparition de variants ne produisant plus (ou peu) de sidérophores durant l'infection chronique va permettre une diminution de la virulence. Cette diminution de production de facteurs de virulence va bien sûr entraîner une diminution de la réponse immunitaire de l'hôte, et donc une meilleure adaptation à cet environnement. Autre conséquence aussi, ces évolutions vont favoriser la cohabitation avec d'autres bactéries. Cette cohabitation peut entraîner indirectement une baisse de la virulence à son tour, permettre l'apparition d'autres variants, et aussi entraîner une recomposition du microbiote (Figure 60). Cette recomposition peut répondre à une nécessité : l'évolution de ces souches a également des conséquences sur les voies métaboliques qui peuvent soit nécessiter la mise en place de nouvelles synergies soit s'appuyer sur des 'solutions' métaboliques proposées au sein du microbiote.

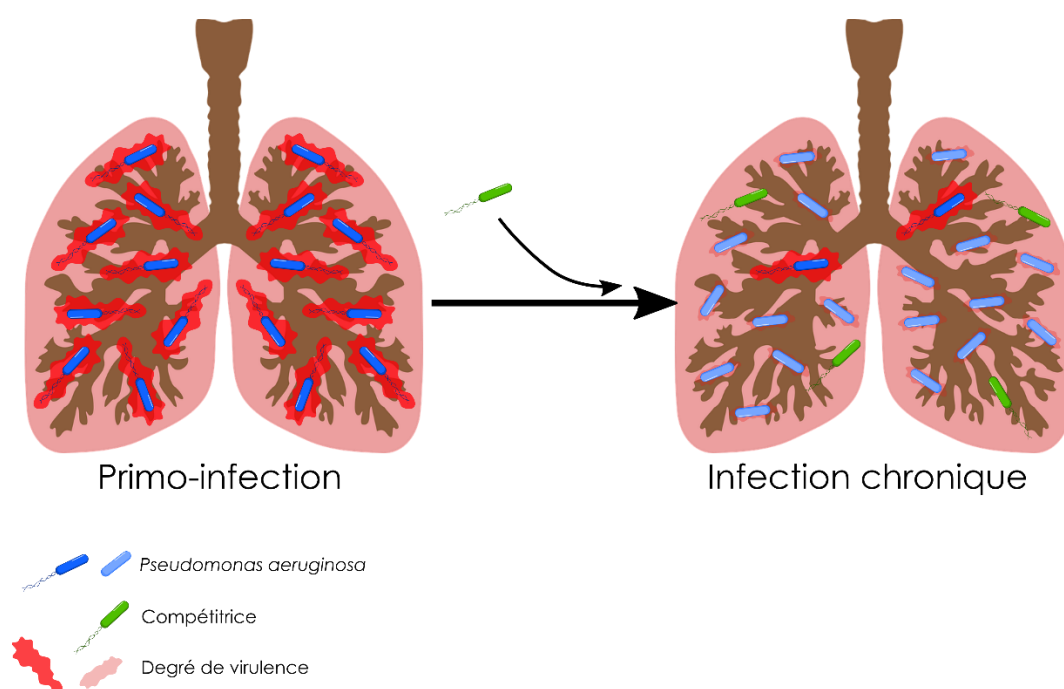


Figure 60 : Représentation schématique de l'hypothèse sur la baisse de virulence. L'évolution de Pa va permettre l'apparition d'une communauté hétérogène au sein même de l'espèce, mais également la cohabitation avec d'autres espèces.

Nous n'avons encore que très peu de données sur la dynamique de cette évolution, qui va dépendre finalement autant de la souche Pa que de l'environnement, qui lui, est spécifique à chaque patient. Il est cependant à noter que ces évolutions, comme on l'a vue pour la lignée B, peuvent

apparaître (ou devenir dominantes) que tardivement au cours de l'infection (9,5 ans pour l'isolement de la souche B25). Cette adaptation n'est donc pas requise pour permettre l'installation d'une infection chronique, mais pourrait être permise par une détérioration de l'état du poumon ou du microbiote.

En conclusion, ce projet de thèse a posé les bases, et a permis d'ouvrir la voie à d'autres études sur le rôle que jouent les sidérophores de *Pa* dans l'infection à travers l'étude de lignées longitudinales de souches de *Pa*, caractérisées entre autres par une évolution de la production de sidérophores au cours de l'infection. Pour poursuivre cette étude il faudra utiliser les autres lignées en notre possession pour confirmer nos observations et peut-être dégager d'autres conclusions complémentaires quant aux rôles des sidérophores et de leur évolution. Il serait aussi très intéressant de complexifier l'étude des interactions en ajoutant d'autres compétiteurs (intra/inter spécifiques) et en observant dans ce cadre l'importance des sidérophores ou de l'absence de leur production, tout en suivant leur évolution sur des temps plus long que 24 h.

Partie IV

Matériel et Méthodes

1. Collection de souches bactériennes

Pour cette étude nous avons utilisé une collection d'isolats cliniques qui nous ont été fournis par le Dr N. Cramer de l'Ecole de Médecine de Hanovre. Ces isolats cliniques sont issus d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose et colonisés de façon chronique par Pa. La liste des isolats et de leurs caractéristiques est présentée dans le [Tableau 4](#). Ces isolats ont tous été séquencés et ce travail d'étude a été publié par J. Klockgether et ses collègues (Klockgether *et al.*, 2018b).

Tableau 4 : Informations concernant les isolats cliniques de Pa. Les souches avec * ont été caractérisées comme hypermutatrices.

Souche	Patient	N° de prélèvement	Temps de colonisation (mois)	Type d'infection	Séquençage du génome	Type de souche
B5	B	5	0	sévère	oui	1BAE
B19	B	19	10	sévère	oui	1BAE
B25*	B	25	35	sévère	oui	1BAE
E1	E	1	0	sévère	oui	1BAE
E35	E	35	80	sévère	oui	1BAE
E71	E	71	161	sévère	oui	1BAE
F1	F	1	0	sévère	oui	AC9A
F27*	F	27	68	sévère	oui	AC9A
F29*	F	29	68	sévère	non	AC9A
F30*	F	30	73	sévère	non	AC9A
G1	G	1	0	sévère	oui	449A
G29*	G	29	67	sévère	oui	449A
G52*	G	52	117	sévère	oui	449A
K1	K	1	0	moyenne	oui	0C2E
K13	K	13	34	moyenne	oui	0C2E
K32	K	32	78	moyenne	oui	0C2E

Les bactéries dites « compétitrices » utilisées dans ce travail nous ont été données par le Dr A. Doléans-Jordheim du Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon. Ces souches sont toutes des isolats cliniques obtenus à partir d'expectorations de patients CF. Ces patients n'étaient en revanche pas forcément infectés par Pa en même temps. Les caractéristiques de ces différentes bactéries sont listées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Informations concernant les bactéries compétitrices.

Espèce bactérienne	N° d'isolat	N° de collection
<i>S. maltophilia</i>	germe 1	196
<i>S. maltophilia</i>	germe 2	197
<i>S. maltophilia</i>	germe 3	198
<i>S. maltophilia</i>	germe 5	199
<i>B. multivorans</i>	01712465990101	200
<i>B. multivorans</i>	01709938800101	201
<i>B. multivorans</i>	01713018280102	202
<i>A. xylosoxidans</i>	016052289701-01	203
<i>A. xylosoxidans</i>	01518733601-02	204
<i>A. xylosoxidans</i>	015036025201-03	205
<i>A. xylosoxidans</i>	015027287701-06	206
<i>A. xylosoxidans</i>	015013664301-05	207
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	016242562601-03	208
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	016202453701-01	209
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	01712715070101	210
<i>B. cepacia</i>	017024405601-01	211
<i>Rhizobium radiobacter</i>	01710792650104	212
<i>Burkholderia gladioli</i>	01710804970103	213
<i>Cupriavidus pauculus</i>	015172891801-04	214
<i>Inqilinus limosus</i>	01709490610101	215

Pour les études concernant le lien entre évolution de Pa et résistance aux ATB, nous avons utilisé la souche modèle de Pa PAO1 (ATCC15692) ainsi que ses mutants de délétion détaillés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Informations concernant les souches de laboratoire de Pa. Tous les mutants ont été obtenus par double recombinaison homologue.

Souche	Gène(s) délété(s)	Souche d'origine	Caractéristiques	N° collection
PAO1 (ATCC15692)	WT	/	PVD + & PCH +	459
PAO1Δ<i>pvdS</i>	<i>pvdS</i>	ATCC15692	PVD - & PCH +	669
PAO1Δ<i>pchR</i>	<i>pchR</i>	ATCC15692	PVD + & PCH -	670
PAO1Δ<i>pvdS</i>Δ<i>pchR</i>	<i>pvdS</i> & <i>pchR</i>	N°670	PVD - & PCH -	671
PAO1Δ<i>fpvA</i>Δ<i>fpvB</i>	<i>fpvA</i> & <i>fpvB</i>	N°911	PVD + & PCH - Import PVD -	912

2. Milieux de culture et préparation des cultures

Toutes les souches sont conservées à -80°C dans du glycérol 25% v/v.

Le milieu *Lysogeny Broth* Lennox (LB) (Euromedex) est utilisé en routine pour la décongélation de la plupart des souches. Pour le préparer 20 g de milieu sont dissout dans 1 L d'eau déminéralisée. Ce milieu peut aussi être utilisé sous sa forme solide LB Lennox agar (Euromedex) à 35 g/L.

Le milieu principal utilisé dans nos études est le milieu appelé « MH chelex ». Il s'agit du milieu Mueller-Hinton II (BD) (22 g/L) traité sur la nuit à 4°C et sous agitation à l'aide d'une résine chelex® 100 sodium form (Sigma-Aldrich) pour 1 L de culture. La solution est ensuite filtrée (Ø 22 µm) en divisant en deux fois 500 mL auxquels sont ajoutés 500 µL de ZnSO₄ (2,87 mg/mL), 1125 µL de CaCl₂ (10 mg/mL) et 562 µL de MgCl₂ (10 mg/mL). Le pH est ensuite ajusté par ajout d'HCl 1 N de façon à atteindre un pH physiologique de 7. Ce milieu a pu, selon les expérimentations, être complété avec 1 % v/v de sérum (FBS Gibco). Pour certaines expérimentations ce milieu a également pu être utilisé sous forme solide avec ajout de 15 g/L d'agar-agar.

Un autre milieu utilisé pour certaines expérimentations est le milieu CasAminoAcids (CAA). C'est un milieu carencé en fer avec moins de 20 nM (Cunrath *et al.*, 2016) et dont la source

de carbone sont des casaminoacides. Pour sa préparation 5 g de bacto casaminoacides (Gibco), 1,46 g de $K_2HPO_4 + 3 H_2O$ et 0,25 g de $MgSO_4 + 7 H_2O$ sont dissouts dans 1 L d'eau purifiée.

Pour étudier le swarming un milieu spécifique a été utilisé. Il s'agit d'un milieu contenant 8 g de LB (Euromedex), 5 g de glucose et 5 g d'agar-agar pour 1 L. Le glucose doit être préparé séparément afin d'être filtré puis ajouté au moment de la préparation des boîtes. Pour étudier le swimming le milieu préparé contient 10 g/L de tryptone (Euromedex), 5 g/L de NaCl et 3 g/L d'agarose. Pour ces deux milieux 20 mL/boîte étaient utilisés, le volume de gélose pouvant exercer une influence sur le résultat. Après coulage, les boîtes sont séchées sur la nuit (ON pour *Over Night*) à Température Ambiante (TA).

De façon générale, pour faire se développer les bactéries compétitrices dans le milieu MH chelex ou MH chelex + 1% sérum, il a d'abord fallu les carencer en fer. Pour ce faire, les souches sont décongelées dans 5 mL de LB (en tubes 50 mL) et cultivées 24 h à 37 °C avec 220 rpm d'agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées 3 min à 8500 rpm puis les culots cellulaires remis en suspension dans 5 mL de milieu MH chelex. Une fois les culots dissouts, les tubes sont à nouveau centrifugés 3 min à 8500 rpm. Les culots sont alors remis en suspension dans 10 mL de MH chelex et incubés ON à 37 °C avec agitation 220 rpm. Pour la bactérie Sa la mise en culture initiale ne se fait pas à partir du stock glycérol mais d'une colonie sur boîte de LB agar. Pour Pa cette étape de carence n'est pas nécessaire et une simple préculture à partir du stock glycérol ON directement en milieu carencé suffit.

3. Suivis de croissance bactérienne avec surnageants de culture

Pour suivre la croissance, une culture de la bactérie testée est préparée en tube 50 mL. 10 mL de milieu MH chelex + 1% sérum ou MH chelex, selon les expérimentations, sont ajustés pour avoir une culture à DO_{600} de 0,02 à laquelle peut être ajouté du surnageant de culture pour que son volume corresponde à 1/10 du volume total ou d'autres molécules (types sidérophores). S'il y a ajout de sidérophores les concentrations finales sont les suivantes : 1 ou 10 μM de PVD pour les cultures de Pa B25, 6 μM de PVD pour les cultures de compétitrices, 2 μM de PCH pour les cultures de compétitrices. Les cultures sont ensuite incubées 7 à 24 h à 37 °C avec agitation 220 rpm. Des mesures d'absorbance à 600 nm sont réalisées à 2,4,5,6,7 (et parfois 24) h.

4. Dosage des sidérophores

Pour la PVD l'absorbance à 400 nm est mesurée sur le surnageant de culture. La concentration est ensuite calculée à l'aide de la loi de Beer-Lambert et grâce aux caractéristiques physico-chimiques de la PVD décrite dans (Hoegy *et al.*, 2014).

Pour la PCH il est nécessaire de procéder à une extraction chimique avant dosage. Pour 1 mL d'échantillon une pointe de spatule d'acide citrique est ajouté puis les tubes sont vortexés quelques secondes. 500 µL d'acétate d'éthyl sont ensuite ajoutés. Les tubes sont à nouveau vortexés et ce pendant 20 sec avant d'être centrifugés 1 min à 14 000 rpm. La phase organique est ensuite récupérée dans un nouveau tube. 500 µL d'acétate d'éthyl sont à nouveau ajoutés à l'ancien tube pour faire une deuxième extraction de manière à extraire le plus de PCH possible. Les tubes sont alors à nouveau vortexés 20 sec puis centrifugés 1 min à 14 000 rpm. La phase organique est à nouveau récupérée et ajoutée à la phase organique déjà extraite. L'absorbance à 320 nm est ensuite mesurée dans une cuve en quartz.

5. Dosage de la production de biofilm

La quantité de biofilm produite est déterminée par dosage à l'aide de cristal violet. Ce protocole est adapté à partir de (Pompilio *et al.*, 2008). Des cultures de 200 µL à DO₆₀₀ de 0,1 sont lancées en plaque 96 puits traitée pour la culture cellulaire (pour une meilleure fixation du biofilm) à partir de précultures. La plaque est ensuite incubée 24 h à 37 °C sans agitation. La culture est ensuite retirée délicatement des puits (chez Pa le biofilm se forme sur les bords du puits, à l'interface air-liquide). Le biofilm est ensuite fixé par séchage 1 h à 60 °C puis 200 µL de cristal violet dilué au 1/10 sont ajoutés suivis d'une incubation de 5 min à TA. Le liquide est enlevé et trois rinçages à l'eau ultrapure sont effectués. La coloration est ensuite fixée par séchage 1 h à 37 °C. 200 µL d'acide acétique à 33% sont ensuite ajoutés dans les puits suivis d'une incubation de 15 min. L'absorbance du cristal violet remis en suspension est ensuite mesurée à 492 nm au lecteur de microplaque Infinite® 200 (Tecan).

6. Etude de la mobilité

Pour compléter la caractérisation physiologique de la collection de souches cliniques de Pa les mobilités de types swimming et swarming ont été suivies. Les boîtes de swimming sont inoculées à partir d'une colonie en piquant jusqu'au fond de la gélose au centre de la boîte. Les boîtes de swarming sont quant à elles inoculées à partir d'une colonie déposée en surface au centre de la boîte. Les boîtes sont incubées à l'endroit ON à 37 °C.

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Pour les différentes parties de ce projet, la résistance à différents ATB a dû être déterminée pour les souches utilisées. Pour ce faire la CMI est déterminée. Les cultures des souches testées sont diluées de façon à avoir une suspension à DO_{600} de 0,0002 en milieu MH. Les ATB à tester sont préparés à une concentration quatre fois supérieure à celle attendue dans le premier puits de la plaque. Dans une plaque 96 puits 100 μ L de milieu MH sont distribués dans tous les puits puis 100 μ L de la solution d'ATB sont ajoutés dans la première colonne de la plaque. L'antibiotique est ensuite dilué en cascade au 1/2 dans 10 puits successifs. 100 μ L de la suspension bactérienne sont ensuite ajoutés dans tous les puits jusqu'à la colonne 11. La colonne 12 contient uniquement du milieu comme témoin de stérilité et la colonne 11 sert de témoin de croissance. La plaque est ensuite incubée 24 h à 37 °C avec agitation 750 rpm. La CMI est ensuite déterminée par observation visuelle, elle correspond au premier puits ne contenant plus de croissance bactérienne.

Dans certains cas il a nécessité la détermination de la CMI_{50} . A la suite de la détermination de la CMI, la DO_{600} est mesurée au lecteur de microplaque Infinite® 200 (Tecan) et la concentration inhibant 50 % de la croissance est évaluée.

8. Caractérisation de la PVD par IEF

L'IEF permet d'obtenir un profil des différentes formes de PVD contenues dans un échantillon ; le protocole a été mis au point par Koedam et ses collègues (Koedam *et al.*, 1994). Les PVD produites par la collection d'isolats cliniques de Pa ont donc été caractérisées par cette

méthode. Tout d'abord les échantillons sont produits à partir de précultures en MH chelex centrifugée 3 min à 8500 rpm. 2 mL des surnageants sont ensuite prélevés en tube de 2 mL, solidifiés par congélation à l'azote liquide pendant 15 min puis lyophilisés ON avec un papier absorbant pour fermer les tubes. Les lyophilisats sont ensuite stockés à -20 °C. Pour la préparation du gel, 2,2 mL d'eau ultrapure, 0,8 mL d'acrylamide, 0,8 mL de glycérol 25 % et 0,2 mL d'ampholytes 3/10 40 % (Bio-Rad) sont mélangés et mis à dégazer pendant 5 min. Sont ensuite ajoutés 6 µL de persulfate d'ammonium à 10 %, 20 µL de flavine mononucléotide 0,1 % et 1,2 µL de tétraméthyléthylènediamine. Le gel est ensuite coulé dans le support et un film hydrophile est déposé par-dessus. Le gel est polymérisé 45 min sous lumière blanche puis retourné et polymérisé encore 15 min. Un fois le gel obtenu 1 µL des échantillons préalablement re-solubilisé dans 40 µL d'eau ultrapure est déposé à sa surface. Le gel est ensuite migré sur des électrodes à carbone pendant plusieurs cycles de migration (15 min à 100 v, 15 min à 200 v puis 45 min à 450 v) à 4 °C. Un fois la migration finalisée le gel peut être révélé aux UltraViolets (UV).

9. Analyses protéomiques

Les souches de Pa en présence ou absence de surnageants de bactéries compétitrices ont été cultivées en milieu MH-chelex. Le sérum n'a pas été rajouté dans ce cas car les protéines sériques pouvaient masquer le signal propre aux bactéries. Après 7h de culture, 10^8 cellules ont été utilisées pour l'analyse protéomique réalisée par la plateforme de l'IBMC (Strasbourg).

10. Analyses transcriptomiques par RT-qPCR

Les RT-qPCR sont réalisées comme décrites dans (Gasser *et al.*, 2016). Brièvement, pour l'obtention d'échantillons un volume de culture correspondant à $2,5 \cdot 10^8$ UFC est prélevé, auquel sont ajoutés 2 volumes de RNA Protect Tissue Reagent (Qiagen), puis vortexé 5 sec avant d'être incubés 5 min à TA. Les culots obtenus sont ensuite traités à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) avec une étape de fragmentation de l'ADN sur colonne QIAshredder (Qiagen) en préambule et deux étapes de digestion de l'ADN en employant le kit RNase-Free DNase Set (Qiagen). La quantité d'ARN extraite est quantifiée par spectrométrie au Nanodrop2000. 1 µg d'ARN est ensuite rétro-transcrit à l'aide du kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). La PCR quantitative

en temps réelle est ensuite réalisée sur 20 ng d'ADNc à l'aide du kit Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) dans un thermocycleur StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les efficacités de réaction des amorces utilisées sont préalablement déterminées par la méthode des courbes standard sur ADN génomique. Lors de la PCR le gène de ménage *uvrD* est utilisé comme gène de référence et les résultats obtenus sont analysés par méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Rao *et al.*, 2013).

11. Evaluation de l'activité chélatrice relative d'un composé par test du CAS

Le protocole développé par Schwyn et Neilands (Schwyn and Neilands, 1987) pour la visualisation de sidérophores en utilisant leCAS a été adapté pour la détection de molécules présentant un fort pouvoir chélateur du fer dans une solution. Pour augmenter la vitesse de réaction (CAS-shuttle) 4 mM d'acide sulfosalicylique sont ajoutés pour 50 μ L de CAS à 7,5 μ M. Après culture des souches testées, les surnageants de cultures sont récupérés. Des dilutions au demi sont faites dans une plaque 96 puits en cascade par ajout de 100 μ L de CAS-shuttle de façon successive. Le changement colorimétrique est ensuite suivi par mesure de l'absorbance à 630 nm dans une lecteur de microplaques Infinite® 200 (Tecan) sur un cycle d'1 h puis après 24 h d'incubation à l'obscurité.

12. Préparation des surnageants de culture

Pour étudier les effets des surnageants de Pa sur les bactéries compétitrices et inversement, des suivis de croissance sont faits en présence des surnageants de culture. Tout d'abord des surnageants de culture doivent être préparés (inspiré de (Radlinski *et al.*, 2017)). Une culture en tube 50 mL est lancée avec 10 mL de milieu MH chelex + 1 % sérum en ajustant la quantité de bactérie de façon à atteindre une DO_{600} de 0,02. La culture est ensuite incubée environ 20 h à 37 °C puis centrifugée 3 min à 8500 rpm. Le surnageant est ensuite récupéré après filtration sur filtre Ø 22 μ m.

13. Production et purification de sidérophores

De la PVD produite par l'isolat Pa B5 est purifiée dans le but d'être utilisée pour les expériences de croissance. Utiliser la PVD produite par cette souche nous permet d'avoir la PVD la plus proche possible de celle utilisable par l'isolat Pa B25.

Après carence en milieu CAA, des cultures en erlenmeyer de 1 L sont lancées en ensemençant directement avec tout le tube de préculture (10 mL). Les suspensions sont incubées 24 h à 30 °C avec agitation 220 rpm. Les cultures sont ensuite centrifugées 40 min à 5000 rpm et les surnageants filtrés successivement sur 3 filtres Whatman puis sur un filtre de nitrocellulose. Les filtrats sont acidifiés à l'aide d'HCl 6 N pour atteindre un pH de 6. Ils sont ensuite passés sur colonne Amberlite® XAD® (Sigma-Aldrich), en sortie de colonne le liquide doit être translucide. La colonne est ensuite lavée 3 fois à l'eau ultrapure puis la PVD est éluée à l'aide d'éthanol 50 % ; en sortie de colonne l'éluat doit être jaune. La solution est ensuite évaporée au bain marie à 37 °C de façon à obtenir un concentrat de couleur jaune. La solution obtenue est ensuite congelée à -80 °C pendant au moins 1 h puis lyophilisée (pendant au moins 48 h). La poudre obtenue est pesée et grâce à la mesure de la DO₄₀₀ et de la loi de Beer-Lambert la concentration de l'échantillon puis sa pureté sont déterminées.

La PCH est quant à elle synthétisée chimiquement par les chimistes de notre équipe comme décrit dans (Noël *et al.*, 2011).

14. Création d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* contenant un tag fluorescent

Le vecteur est celui construit dans le chapitre II des résultats.

Les isolats B5 et B25 de Pa ont été transformés par double conjugaison homologue comme suit. Le vecteur suicide pEXG2 a été transféré par conjugaison à partir d'une souche d'*E. coli* SM10. Les clones possédant le plasmide ont été sélectionnés par résistance à la gentamicine mais les concentrations ont dûes être adaptées à la forte résistance des isolats B5 et B25 à cet ATB. Les mutants dont le plasmide a été inséré dans le chromosome sont ensuite sélectionnés sur boîtes LB

sans NaCl et contenant 6 % de sucrose. Les clones résistants au sucrose sont ensuite vérifiés par PCR sur colonies et la bonne insertion de l'insert est vérifiée par séquençage.

15. Co-cultures entre Pa et les bactéries compétitrices

De nouvelles cultures contenant à la fois une souche de Pa et une souche de bactérie compétitrice sont préparées à partir de précultures. Le ratio Pa:compétitrice est de 1:1 ou 1:50. Les cultures sont lancées en tubes de 50 mL, dans 10 mL de milieu MH chelex + 1 % sérum en ayant pour chaque souche 1.10^7 UFC/mL. Les tubes sont ensuite incubés 24 h à 37 °C avec agitation et des prélèvements sont faits à 2, 4, 5, 6, 7 et 24 h de croissance pour suivre le nombre d'UFC/mL. Pour cela, 100 µL de culture sont prélevés et dilués en cascade au 1/10. Les dilutions utilisées pour les dénombrements ne sont pas les mêmes en fonction des temps de culture. Pour la condition ratio 1:1 les dépôts sont faits en gouttes, 20 µL de chaque dilution sont déposés en gouttes, répété 6 fois pour chaque dilution. Le tout sur boîte de LB. Les gouttes sont séchées 20 min sous atmosphère stérile. Pour la condition 1:50 les dépôts sont fait par étalement de 100 µL sur des boîtes entières. Puis les boites sont incubées 24 h à 37 °C et les UFC dénombrées par comptage manuel. Les colonies de Pa taguées au mCherry sont dénombrées suite au scan des boîtes grâce à un scanner Amersham Typhoon (GE Life Sciences) où elles apparaissent noires due à leur fluorescence. Le nombre de colonies de compétitrices est ensuite obtenu par calcul et la concentration en UFC/mL déterminée. Au moment des prélèvements, 200 µL sont également récupérés et centrifugés 10 min à 4000 rpm. Le surnageant est ensuite prélevé et stocké à 4 °C jusqu'à la fin de l'expérience. La DO_{400} ainsi que la fluorescence (Excitation 400 nm ; Emission 470 nm) sont ensuite mesurées pour suivre l'évolution de la production de PVD.

16. Suivi de croissance d'Ax en présence de PVD

Après préculture, la bactérie est inoculée de façon à obtenir une DO_{600} initiale de 0,02 dans 10 mL de milieu MH chelex + 1 % sérum/sans sérum dans un tube de 50 mL. Deux concentrations de PVD purifiées sont ajoutées, 6 et 0,6 µM. Les cultures sont ensuite incubées 7 h à 37°C avec agitation 220 rpm. La croissance est suivie par mesure de la DO_{600} à 0-2-4-5-6-7 h.

17. Suivi de fluorescence de la PVD

Après préculture, une plaque 96 puits est inoculée avec Ax à une DO_{600} initiale de 0,002. A ces cultures sont ajoutées différentes conditions de PVD. Soit de l'apoPVD, du fer ou du complexe ferri-PVD, tous à une concentration de 600 nM. Le complexe ferri-PVD est obtenu en mélangeant de façon équimolaire 600 nM d'apoPVD et de fer. Le mélange est ensuite incubé 15 min à TA. La plaque est ensuite incubée 24 h et différents paramètres suivis dans un lecteur de microplaque Infinite® 200 (Tecan) avec agitation toutes les 15 min et mesure de la DO_{600} , DO_{400} et de la fluorescence (excitation 400 nm et émission 470 nm).

18. Etude de l'effet du surnageant de différentes lignées de Pa sur une collection de compétitrices

Pour aller plus loin nous avons reproduit les expériences de culture en présence de surnageant, cette fois en plaque 96 puits dans le but de pouvoir screener un plus grand nombre de souches. Les pré-cultures et les surnageants sont préparés comme décrit plus haut. La plaque est ensuiteensemencée avec les bactéries compétitrices à une DO_{600} de 0,02 dans 200 μ L de MH chelex + 1 % sérum avec 1/10 v/v de surnageant de Pa. La plaque est ensuite incubée 24 h à 37 °C dans un lecteur de microplaque Infinite® 200 (Tecan) avec agitation toutes les 15 min et mesure de la DO_{600} .

19. Co-cultures de différents mutants de Pa en présence d'une pression ATB sur 10 jours

Des cultures des différentes souches soit seules soit en co-culture sont préparées de façon à avoir une DO_{600} totale de 0,2 en testant des ratios 1:1, 1:3 et 3:1. Les cultures sont ensuite diluées au 1/10 et dispensées dans une plaque 96 puits. Différents ATB sont ensuite ajoutés en fonction des conditions à des concentrations sub-inhibitrices ($CMI/2$). La plaque est ensuite incubée à 37 °C avec agitation 300 rpm pendant 10 jours. Chaque 24 h, les cultures sont repiquées dans une nouvelle plaque contenant du milieu neuf en les diluant au 1/100. Au temps 0, 4 et 10 jours, après repiquage, les plaques sont centrifugées 15 min à 3000 rpm, le surnageant est jeté et une PCR est

faite sur le gène délété ou non dans la co-culture en prélevant un peu de culot cellulaire. Les produits PCR sont ensuite migrés sur gel d'agarose 1 % et le gel révélé aux UV. L'image du gel est ensuite traitée à l'aide du logiciel ImageJ où l'intensité relative des bandes est déterminée par traitement de l'image et le ratio entre les deux souches déterminé (Figure 60).

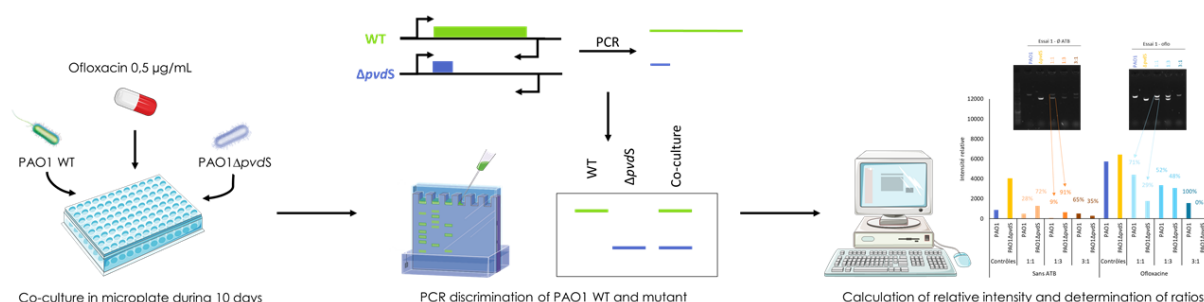


Figure 61 : Schéma explicatif de la méthode des ratios de co-cultures.

20. Sélection de mutants résistants aux ATB par la méthode du gradient de Szybalski

En 1952 Szybalski et Bryson ont mis au point une méthode sur boîte permettant de générer des mutants résistants aux ATB (Szybalski and Bryson, 1952b). La même approche a été utilisée pour comparer l'adaptation transitoire à la présence d'ATB des différents mutants de Pa en co-culture. Le jour même de l'expérience, des boîtes carrées sont préparées avec un gradient de concentration d'ATB. Pour cela, 45 mL de MH chelex agar contenant l'ATB à concentration correspondant à la CMI sont coulés en inclinant la boîte de façon à avoir une pente de la gélose. Après séchage pendant une vingtaine de minutes, une deuxième épaisseur de MH chelex agar (45 mL) est coulée en inclinant la boîte dans l'autre sens et le séchage se fait cette fois à plat (Figure 61). Une culture des différentes souches seules ou en co-culture est préparée à une DO_{600} de 0,1 puis 1 mL de cette suspension est étalée sur la surface de la gélose. Les boîtes sont séchées sous atmosphère stérile puis incubées à l'envers pendant 6 jours. Les colonies apparues en dehors du tapis bactérien, là où les concentrations d'ATB sont les plus fortes sont remises en culture dans 5 mL de LB ON à 37 °C avec agitation 220 rpm puis stockées à -80 °C dans du glycérol. Ces colonies sont également identifiées par PCR sur le gène délété ou non.

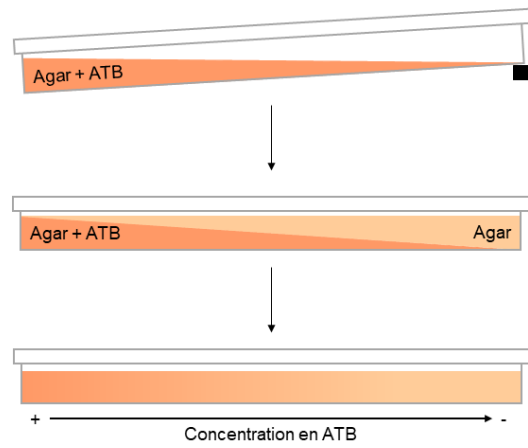


Figure 62 : Préparation des boîtes contenant un gradient de Szybalski.

Bibliographie

Bibliographie

- 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**: 173.
- Ader, F., Jawhara, S., Nseir, S., Kipnis, E., Faure, K., Vuotto, F., et al. (2011) Short term *Candida albicans* colonization reduces *Pseudomonas aeruginosa*-related lung injury and bacterial burden in a murine model. *Crit Care Lond Engl* **15**: R150.
- Adler, C., Corbalan, N.S., Peralta, D.R., Pomares, M.F., de Cristóbal, R.E., and Vincent, P.A. (2014) The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. *PLoS ONE* **9**:
- Adler, C., Corbalán, N.S., Seyedsayamdost, M.R., Pomares, M.F., de Cristóbal, R.E., Clardy, J., et al. (2012) Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. *PloS One* **7**: e46754.
- Alav, I., Sutton, J.M., and Rahman, K.M. (2018) Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* **73**: 2003–2020.
- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**: 6391–6402.
- Anzaldi, L.L. and Skaar, E.P. (2010) Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* **78**: 4977–4989.
- Armbruster, C.R., Wolter, D.J., Mishra, M., Hayden, H.S., Radey, M.C., Merrihew, G., et al. (2016) *Staphylococcus aureus* protein A mediates interspecies interactions at the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **7**: e00538-16.
- Armstrong, S.K., Brickman, T.J., and Suhadolc, R.J. (2012) Involvement of multiple distinct *Bordetella* receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Mol Microbiol* **84**: 446–462.
- Bacci, G., Rossi, A., Armanini, F., Cangioli, L., De Fino, I., Segata, N., et al. (2021) Lung and gut microbiota changes associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection in mouse models of cystic fibrosis. *Int J Mol Sci* **22**: 12169.

- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005a) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11076–11081.
- Bassis, C.M., Erb-Downward, J.R., Dickson, R.P., Freeman, C.M., Schmidt, T.M., Young, V.B., et al. (2015) Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio* **6**: e00037.
- 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.
- Besson-Fournier, C., Latour, C., Kautz, L., Bertrand, J., Ganz, T., Roth, M.-P., and Coppin, H. (2012) Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* **120**: 431–439.
- Biswas, G.D. and Sparling, P.F. (1995) Characterization of lbpA, the structural gene for a lactoferrin receptor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **63**: 2958–2967.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* **44**: 547–558.
- Blackman, S.M., Commander, C.W., Watson, C., Arcara, K.M., Strug, L.J., Stonebraker, J.R., et al. (2013) Genetic modifiers of cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes* **62**: 3627–3635.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., and Piddock, L.J.V. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**: 42–51.
- Bonneau, A., Roche, B., and Schalk, I.J. (2020) Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Sci Rep* **10**: 120.
- Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lorè, N.I., et al. (2012) Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLoS One* **7**: e52330.
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Albrecht-Gary, A.-M. (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Trans Camb Engl* **2003** **41**: 2820–2834.

- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I.J. (2009) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol* **11**: 1079–1091.
- Braun, V. and Braun, M. (2002) Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr Opin Microbiol* **5**: 194–201.
- Briard, B., Bomme, P., Lechner, B.E., Mislin, G.L.A., Lair, V., Prévost, M.-C., et al. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Sci Rep* **5**: 8220.
- Briard, B., Heddergott, C., and Latgé, J.-P. (2016) Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mBio* **7**: e00219.
- Briard, B., Mislin, G.L.A., Latgé, J.-P., and Beauvais, A. (2019) Interactions between *Aspergillus fumigatus* and pulmonary bacteria: current state of the field, new data, and future perspective. *J Fungi Basel Switz* **5**..
- Briaud, P., Camus, L., Bastien, S., Doléans-Jordheim, A., Vandenesch, F., and Moreau, K. (2019) Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells. *Sci Rep* **9**..
- Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., et al. (2012) An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* **7**: 2036–2045.
- Britigan, B.E., Rasmussen, G.T., and Cox, C.D. (1997) Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect Immun* **65**: 1071–1076.
- Brooke, J.S. (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* **25**: 2–41.
- Brown, R.L., Sequeira, R.P., and Clarke, T.B. (2017) The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun* **8**: 1512.
- Budzikiewicz, H. (1997) Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z Naturforschung C J Biosci* **52**: 713–720.
- Butt, A.T. and Thomas, M.S. (2017a) Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of *Burkholderia* species. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 460.

- Camus, L., Briaud, P., Bastien, S., Elsen, S., Doléans-Jordheim, A., Vandenesch, F., and Moreau, K. (2020) Trophic cooperation promotes bacterial survival of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J*.
- Camus, L., Briaud, P., Vandenesch, F., and Moreau, K. (2021) How bacterial adaptation to cystic fibrosis environment shapes interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **12**..
- Carballido Lopez, A., Cunrath, O., Forster, A., Pérard, J., Graulier, G., Legendre, R., et al. (2019) Non-specific interference of cobalt with siderophore-dependent iron uptake pathways. *Met Integr Biometal Sci*.
- Caza, M. and Kronstad, J.W. (2013) Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 80.
- Cescau, S., Cwerman, H., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., and Biville, F. (2007) Heme acquisition by hemophores. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **20**: 603–613.
- Charlson, E.S., Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., et al. (2011) Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* **184**: 957–963.
- Choi, K.-H. and Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**: 153–161.
- Collaco, J.M., Vanscoy, L., Bremer, L., McDougal, K., Blackman, S.M., Bowers, A., et al. (2008) Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA* **299**: 417–424.
- Cornelis, P. and Dingemans, J. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 75.
- Cornelissen, C.N., Biswas, G.D., Tsai, J., Paruchuri, D.K., Thompson, S.A., and Sparling, P.F. (1992) Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *J Bacteriol* **174**: 5788–5797.
- Costello, A., Reen, F.J., O’Gara, F., Callaghan, M., and McClean, S. (2014) Inhibition of co-colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiol Read Engl* **160**: 1474–1487.

- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., and Cook, J.C. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4256–4260.
- Cramer, N., Fischer, S., Hedtfeld, S., Dorda, M., and Tümmler, B. (2020) Intracolon competitive fitness of longitudinal cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates in liquid cultures. *Environ Microbiol* **22**: 2536–2549.
- Cullen, L. and McClean, S. (2015) Bacterial adaptation during chronic respiratory infections. *Pathog Basel Switz* **4**: 66–89.
- Cunrath, O., Geoffroy, V.A., and Schalk, I.J. (2016) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ Microbiol* **18**: 3258–3267.
- Cystic Fibrosis Foundation (2019) 2019 Patient Registry Annual Data Report. 92.
- Delmar, J.A., Su, C.-C., and Yu, E.W. (2014) Bacterial multidrug efflux transporters. In *Annual Review of Biophysics, Vol 43*. Dill, K.A. (ed). Palo Alto: Annual Reviews, pp. 93–117.
- Demange, P., Bateman, A., Mertz, C., Dell, A., Piémont, Y., and Abdallah, M.A. (1990) Bacterial siderophores: structures of pyoverdins Pt, siderophores of *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192, and pyoverdins Pf, siderophores of *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Identification of an unusual natural amino acid. *Biochemistry* **29**: 11041–11051.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Freeman, C.M., McCloskey, L., Beck, J.M., Huffnagle, G.B., and Curtis, J.L. (2015) Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc* **12**: 821–830.
- Dingemans, J., Ye, L., Hildebrand, F., Tontodonati, F., Craggs, M., Bilocq, F., et al. (2014) The deletion of TonB-dependent receptor genes is part of the genome reduction process that occurs during adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung. *Pathog Dis* **71**: 26–38.
- Drago-Serrano, M.E., Campos-Rodríguez, R., Carrero, J.C., and de la Garza, M. (2017) Lactoferrin: balancing ups and downs of inflammation due to microbial infections. *Int J Mol Sci* **18**: E501.
- Drago-Serrano, M.E., Parra, S.G., and Manjarrez-Hernández, H.A. (2006) EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett* **265**: 35–40.
- Drumm, M.L., Konstan, M.W., Schluchter, M.D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., et al. (2005) Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **353**: 1443–1453.

- Dunphy, L.J., Grimes, K.L., Wase, N., Kolling, G.L., and Papin, J.A. (2021) Untargeted metabolomics reveals species-specific metabolite production and shared nutrient consumption by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *mSystems* **6**: e0048021.
- Edgar, R.J., Hampton, G.E., Garcia, G.P.C., Maher, M.J., Perugini, M.A., Ackerley, D.F., and Lamont, I.L. (2017) Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **106**: 891–904.
- Edwards, B.D., Greysson-Wong, J., Somayaji, R., Waddell, B., Whelan, F.J., Storey, D.G., et al. (2017) Prevalence and outcomes of *Achromobacter* species infections in adults with cystic fibrosis: a North American cohort study. *J Clin Microbiol* **55**: 2074–2085.
- El Zowalaty, M.E., Al Thani, A.A., Webster, T.J., El Zowalaty, A.E., Schweizer, H.P., Nasrallah, G.K., et al. (2015) *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol* **10**: 1683–1706.
- Endicott, N.P., Lee, E., and Wencewicz, T.A. (2017) Structural basis for xenosiderophore utilization by the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect Dis* **3**: 542–553.
- Esposito, A., Pompilio, A., Bettua, C., Crocetta, V., Giacobazzi, E., Fiscarelli, E., et al. (2017) Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis lung over chronic infection: a genomic and phenotypic population study. *Front Microbiol* **8**: 1590.
- Evans, T.J. (2015) Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. *Future Microbiol* **10**: 231–239.
- Faure, E., Kwong, K., and Nguyen, D. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections: how to adapt within the host? *Front Immunol* **9**: 2416.
- Fenton, H.J.H. (1894) LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* **65**: 899–910.
- Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., and Hancock, R.E.W. (2010) Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3372–3382.
- Finberg, K.E. (2013) Regulation of systemic iron homeostasis. *Curr Opin Hematol* **20**: 208–214.
- Flanagan, J.N. and Steck, T.R. (2017) The relationship between agar thickness and antimicrobial susceptibility testing. *Indian J Microbiol* **57**: 503–506.

- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., et al. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**: 917–921.
- Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B.J., and Redl, B. (2004) Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3367–3372.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., and Molin, S. (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**: 841–851.
- Fothergill, J.L., Mowat, E., Ledson, M.J., Walshaw, M.J., and Winstanley, C. (2010) Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations. *J Med Microbiol* **59**: 472–481.
- Fourie, R., Ells, R., Swart, C.W., Sebolai, O.M., Albertyn, J., and Pohl, C.H. (2016) *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. *Front Physiol* **7**: 64.
- Francis, J. and Madinaveitia, J. (1949) Isolation from acid-fast bacteria of a growth-factor for *Mycobacterium johnei* and of a precursor of phthiocol. *Nature* **163**: 365.
- Ganz, T. and Nemeth, E. (2015) Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**: 500–510.
- Garibaldi, J.A. and Neilands, J.B. (1956) Formation of iron-binding compounds by micro-organisms. *Nature* **177**: 526–527.
- Gasser, V., Baco, E., Cunrath, O., August, P.S., Perraud, Q., Zill, N., et al. (2016) Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunity for siderophore-antibiotic conjugates development. *Environ Microbiol* **18**: 819–832.
- Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., and Schalk, I.J. (2015) Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *J Inorg Biochem* **148**: 27–34.

- Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., and Cornelis, P. (2004) FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **150**: 1671–1680.
- Golonka, R., Yeoh, B.S., and Vijay-Kumar, M. (2019) The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *J Innate Immun* **11**: 249–262.
- Goss, C.H., Newsom, S.A., Schildcrout, J.S., Sheppard, L., and Kaufman, J.D. (2004) Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **169**: 816–821.
- Hall, C.W. and Mah, T.-F. (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 276–301.
- Hammer, N.D. and Skaar, E.P. (2011) Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol* **65**: 129–147.
- Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **584**: 4751–4755.
- Hans Wedepohl, K. (1995) The composition of the continental crust. *Geochim Cosmochim Acta* **59**: 1217–1232.
- Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., and Høiby, N. (2010) Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* **9**: 51–58.
- Hantke, K. (1987) Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 53–57.
- Hassett, D.J., Sokol, P.A., Howell, M.L., Ma, J.F., Schweizer, H.T., Ochsner, U., and Vasil, M.L. (1996) Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* **178**: 3996–4003.
- Haute Autorité de Santé (2017) Protocole national de diagnostic et de soins Mucoviscidose.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., and AlNashef, I.M. (2016) Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem Rev* **116**: 3029–3085.

- Heli, H., Mirtorabi, S., and Karimian, K. (2011) Advances in iron chelation: an update. *Expert Opin Ther Pat* **21**: 819–856.
- Hesseltine, C.W., Pidacks, C., Whitehill, A.R., Bohonos, N., Hutchings, B.L., and Williams, J.H. (2002) Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi. *ACS Publ.*
- Hider, R.C. and Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**: 637–657.
- Hoegy, F., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1149**: 293–301.
- Høiby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* **5**: 1663–1674.
- Huang, Y.J. and LiPuma, J.J. (2016) The microbiome in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* **37**: 59–67.
- Ichiki, K., Ikuta, K., Addo, L., Tanaka, H., Sasaki, Y., Shimonaka, Y., et al. (2014) Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . *J Gastroenterol Hepatol* **29**: 387–394.
- Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Awang Hamat, R., and Neela, V.K. (2018) Iron and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: all we know so far. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 401.
- Kang, D., Revtovich, A.V., Chen, Q., Shah, K.N., Cannon, C.L., and Kirienko, N.V. (2019) Pyoverdine-dependent virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Front Microbiol* **10**: 2048.
- Keravec, M., Mounier, J., Guilloux, C.-A., Fangous, M.-S., Mondot, S., Vallet, S., et al. (2019) *Porphyromonas*, a potential predictive biomarker of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in cystic fibrosis. *BMJ Open Respir Res* **6**: e000374.
- Khademi, S.M.H., Gabrielaite, M., Paulsson, M., Knulst, M., Touriki, E., Marvig, R.L., and Pålman, L.I. (2021) Genomic and phenotypic evolution of *Achromobacter xylosoxidans* during chronic airway infections of patients with cystic fibrosis. *mSystems* e0052321.
- Kirienko, N.V., Ausubel, F.M., and Ruvkun, G. (2015) Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 1821–1826.
- Klockgether, J., Cramer, N., Fischer, S., Wiehlmann, L., and Tümmler, B. (2018a) Long-term microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* differs between mildly and severely affected cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* **59**: 246–256.

- Koedam, N., Wittouck, E., Gaballa, A., Gillis, A., Höfte, M., and Cornelis, P. (1994) Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric focusing and chrome azurol S overlay. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **7**: 287–291.
- Konings, A.F., Martin, L.W., Sharples, K.J., Roddam, L.F., Latham, R., Reid, D.W., and Lamont, I.L. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs. *Infect Immun* **81**: 2697–2704.
- Kümmerli, R., Santorelli, L.A., Granato, E.T., Dumas, Z., Dobay, A., Griffin, A.S., and West, S.A. (2015a) Co-evolutionary dynamics between public good producers and cheats in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J Evol Biol* **28**: 2264–2274.
- Kümmerli, R., Santorelli, L.A., Granato, E.T., Dumas, Z., Dobay, A., Griffin, A.S., and West, S.A. (2015b) Co-evolutionary dynamics between public good producers and cheats in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J Evol Biol* **28**: 2264–2274.
- Lambiase, A., Catania, M.R., Del Pezzo, M., Rossano, F., Terlizzi, V., Sepe, A., and Raia, V. (2011) *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **30**: 973–980.
- Lamont, I.L. and Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **149**: 833–842.
- Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 273–298.
- Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi, D. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* **72**: 4275–4278.
- Leinweber, A., Weigert, M., and Kümmerli, R. (2018) The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* senses and gradually responds to interspecific competition for iron. *Evol Int J Org Evol*.
- Lewenza, S. (2013) Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **4**: 21.
- Llamas, M., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**.

- Lopez-Medina, E., Fan, D., Coughlin, L.A., Ho, E.X., Lamont, I.L., Reimmann, C., et al. (2015) *Candida albicans* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence through suppression of pyochelin and pyoverdine biosynthesis. *PLoS Pathog* **11**: e1005129.
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J., and Hahn, H. (2003) Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* **41**: 1062–1068.
- Lupo, A., Haenni, M., and Madec, J.-Y. (2018) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr* **6**..
- Lynch, S.V. (2014) Viruses and microbiome alterations. *Ann Am Thorac Soc* **11 Suppl 1**: S57-60.
- Lyte, M. and Ernst, S. (1993) Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* **50**..
- Man, W.H., de Steenhuijsen PETERS, W.A.A., and Bogaert, D. (2017) The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* **15**: 259–270.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., de Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-González, M.I. (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**: 1842–1850.
- Maule, G., Arosio, D., and Cereseto, A. (2020) Gene therapy for cystic fibrosis: progress and challenges of genome editing. *Int J Mol Sci* **21**: E3903.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., et al. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906–909.
- McGuigan, L. and Callaghan, M. (2015) The evolving dynamics of the microbial community in the cystic fibrosis lung. *Environ Microbiol* **17**: 16–28.
- Mendel, G.A. (1964) Iron metabolism and etiology of iron-storage diseases; an interpretive formulation. *JAMA* **189**: 45–53.
- Menetrey, Q., Dupont, C., Chiron, R., Jumas-Bilak, E., and Marchandin, H. (2020) High occurrence of bacterial competition among clinically documented opportunistic pathogens including *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis. *Front Microbiol* **11**..
- Menetrey, Q., Sorlin, P., Jumas-Bilak, E., Chiron, R., Dupont, C., and Marchandin, H. (2021) *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging pathogens well-armed for life in the cystic fibrosis patients' lung. *Genes* **12**: 610.

- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A.Y. 1978 (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* **107**: 319–328.
- Meyer, J.M. and Hornsperger, J.M.Y. 1978 (1978) Role of pyoverdine Pf, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *Microbiology* **107**: 329–331.
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997) Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiol Read Engl* **143 (Pt 1)**: 35–43.
- Meynet, E., Laurin, D., Lenormand, J.L., Camara, B., Toussaint, B., and Le Gouëllec, A. (2018) Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa*-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *Vaccine* **36**: 1893–1900.
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and Reimann, C. (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**: 495–509.
- Miethke, M., Kraushaar, T., and Marahiel, M.A. (2013) Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS Lett* **587**: 206–213.
- Miethke, M. and Skerra, A. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1580–1589.
- Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., et al. (2016) Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. *Infect Immun* **84**: 2324–2335.
- Mislin, G.L.A. and Schalk, I.J. (2014) Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Met Integr Biometal Sci* **6**: 408–420.
- Mitchell, G., Séguin, D.L., Asselin, A.-E., Déziel, E., Cantin, A.M., Frost, E.H., et al. (2010) *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* **10**: 33.

- Morrissey, J.A., Cockayne, A., Hill, P.J., and Williams, P. (2000) Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **68**: 6281–6288.
- Mould, D.L., Botelho, N.J., and Hogan, D.A. (2020) Intra-species signaling between *Pseudomonas aeruginosa* genotypes increases production of quorum sensing controlled virulence factors. 2020.04.29.068346.
- Nas, M.Y. and Cianciotto, N.P. (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* produces an EntC-dependent catecholate siderophore that is distinct from enterobactin. *Microbiol Read Engl* **163**: 1590–1603.
- Nas, M.Y., Gabell, J., and Cianciotto, N.P. (2021) Effectors of the *Stenotrophomonas maltophilia* type IV secretion system mediate killing of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* e0150221.
- Neilands, J.B. (2002) A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*)1. *ACS Publ*.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., and Ganz, T. (2004) IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* **113**: 1271–1276.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., et al. (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* **110**: 1037–1044.
- Noël, S., Guillon, L., Schalk, I.J., and Mislin, G.L.A. (2011) Synthesis of fluorescent probes based on the pyochelin siderophore scaffold. *Org Lett* **13**: 844–847.
- Normant, V., Kuhn, L., Munier, M., Hammann, P., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2021) How the presence of hemin affects the expression of the different iron uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa* cells. *ACS Infect Dis*.
- O'Brien, S. and Fothergill, J.L. (2017) The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol Lett* **364**..
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., Lamont, I.L., Cunliffe, H.E., and Vasil, M.L. (1996) Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated pvdS gene encoding an alternative sigma factor. *Mol Microbiol* **21**: 1019–1028.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **146 (Pt 1)**: 185–198.

Ochsner, U.A. and Vasil, M.L. (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4409–4414.

Oliver, A. (2010) Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: Prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. *Int J Med Microbiol IJMM* **300**: 563–572.

O'Neill, M.J., Bhakta, M.N., Fleming, K.G., and Wilks, A. (2012) Induced fit on heme binding to the *Pseudomonas aeruginosa* cytoplasmic protein (PhuS) drives interaction with heme oxygenase (HemO). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5639–5644.

Organisation Mondiale de la Santé (2017) Liste OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques.

Otero-Asman, J.R., García-García, A.I., Civantos, C., Quesada, J.M., and Llamas, M.A. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule heme. *Environ Microbiol*.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E.W. (2008a) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2671–2679.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E.W. (2008b) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2671–2679.

Pan, S.-Y., Shih, Y.-L., Huang, H.-H., Li, L.-H., Lin, Y.-T., and Yang, T.-C. (2021) The involvement of PacIRA system of *Stenotrophomonas maltophilia* in the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin and intraspecies competition for iron acquisition. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* S1684-1182(21)00052-9.

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.

Parkins, M.D. and Floto, R.A. (2015) Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* **14**: 293–304.

Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P., and Poole, K. (2008) Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**: 662–671.

Perault, A., Chandler, C., Rasko, D., Ernst, R., Wolfgang, M., and Cotter, P. (2020) Host adaptation predisposes *Pseudomonas aeruginosa* to type VI secretion system-mediated predation by the *Burkholderia cepacia* complex. *Cell Host Microbe* **28**:

Pereira, R.H.V., Leão, R.S., Carvalho-Assef, A.P., Albano, R.M., Rodrigues, E.R.A., Firmida, M.C., et al. (2017) Patterns of virulence factor expression and antimicrobial resistance in *Achromobacter xylosoxidans* and *Achromobacter rublandii* isolates from patients with cystic fibrosis. *Epidemiol Infect* **145**: 600–606.

Pernet, E., Guillemot, L., Burgel, P.-R., Martin, C., Lambeau, G., Sermet-Gaudelus, I., et al. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat Commun* **5**: 5105.

Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V.P., Kuhn, L., et al. (2020) Phenotypic adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Mol Cell Proteomics MCP* **19**: 589–607.

Perraud, Q., Kuhn, L., Fritsch, S., Graulier, G., Gasser, V., Normant, V., et al. (2020) Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.

Perraud, Q., Moynié, L., Gasser, V., Munier, M., Godet, Hoegy, F., et al. (2018) A Key Role for the periplasmic PfeE esterase in iron acquisition via the siderophore enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* **13**:

Pires, D.P., Vilas Boas, D., Sillankorva, S., and Azeredo, J. (2015) Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Virol* **89**: 7449–7456.

Pompilio, A., Ciavardelli, D., Crocetta, V., Consalvo, A., Zappacosta, R., Di Ilio, C., and Di Bonaventura, G. (2014) *Stenotrophomonas maltophilia* virulence and specific variations in trace elements during acute lung infection: implications in cystic fibrosis. *PLoS One* **9**: e88769.

Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., and Di Bonaventura, G. (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 41–47.

Poole, K., Neshat, S., Krebs, K., and Heinrichs, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 4597–4604.

- Poole, K., Young, L., and Neshat, S. (1990) Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**..
- Poulain, D. (2015) *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **41**: 208–217.
- Price, C.E., Brown, D.G., Limoli, D.H., Phelan, V.V., and O'Toole, G.A. (2019) Exogenous alginate protects *Staphylococcus aureus* from killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*.
- Radlinski, L., Rowe, S.E., Kartchner, L.B., Maile, R., Cairns, B.A., Vitko, N.P., et al. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol* **15**: e2003981.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013) An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* **3**: 71–85.
- Ratjen, F., Bell, S.C., Rowe, S.M., Goss, C.H., Quittner, A.L., and Bush, A. (2015a) Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primer* **1**: 15010.
- Rédly, G.A. and Poole, K. (2003) Pyoverdine-mediated regulation of FpvA synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a probable extracytoplasmic-function sigma factor, FpvI. *J Bacteriol* **185**: 1261–1265.
- Registre français de la mucoviscidose (2019) Bilan des données 2019.
- Reid, D.W., Carroll, V., O'May, C., Champion, A., and Kirov, S.M. (2007) Increased airway iron as a potential factor in the persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Eur Respir J* **30**: 286–292.
- Roche, B., Garcia-Rivera, M.A., Normant, V., Kuhn, L., Hammann, P., Brönstrup, M., et al. (2021) A role for PchHI as the ABC transporter in iron acquisition by the siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.
- Ronnebaum, T.A. and Lamb, A.L. (2018) Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Curr Opin Struct Biol* **53**: 1–11.
- Safo, M.K., Ahmed, M.H., Ghatge, M.S., and Boyiri, T. (2011) Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 797–809.
- Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M., and Dominguez-Vera, J.M. (2017) Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* **69**: 382–388.

- Sandri, A., Haagensen, J.A.J., Veschetti, L., Johansen, H.K., Molin, S., Malerba, G., et al. (2021) Adaptive Interactions of *Achromobacter* spp. with *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Chronic Lung Co-Infection. *Pathog Basel Switz* **10**: 978.
- Santé Publique France (2018) Enquête nationale de prévalance des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé.
- Sato, T. and Yamawaki, K. (2019) Cefiderocol: discovery, chemistry, and in vivo profiles of a novel siderophore cephalosporin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **69**: S538–S543.
- Schalk, I.J., Hannauer, M., and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* **13**: 2844–2854.
- Schalk, I.J., Rigouin, C., and Godet, J. (2020) An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ Microbiol* **22**: 1447–1466.
- Schmidt-Ott, K.M., Mori, K., Li, J.Y., Kalandadze, A., Cohen, D.J., Devarajan, P., and Barasch, J. (2007) Dual action of neutrophil gelatinase–associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* **18**: 407–413.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Silva, I.N., Ferreira, A.S., Becker, J.D., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., He, J., et al. (2011) Mucoid morphotype variation of *Burkholderia multivorans* during chronic cystic fibrosis lung infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence. *Microbiol Read Engl* **157**: 3124–3137.
- Siraki, A., Smythies, J., and O'Brien, P. (2000) Superoxide radical scavenging and attenuation of hypoxia-reoxygenation injury by neurotransmitter ferric complexes in isolated rat hepatocytes. *Neurosci Lett* **296**..
- Smith, A.D. and Wilks, A. (2015) Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **290**: 7756–7766.
- Sokol, P.A. (1986) Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *J Clin Microbiol* **23**: 560–562.
- Sokol, P.A. and Woods, D.E. (1988) Effect of pyochelin on *Pseudomonas cepacia* respiratory infections. *Microb Pathog* **5**: 197–205.

- Stites, S.W., Walters, B., O'Brien-Ladner, A.R., Bailey, K., and Wesselius, L.J. (1998) Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis. *Chest* **114**: 814–819.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.
- Sun, J., Deng, Z., and Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* **453**: 254–267.
- Szybalski, W. and Bryson, V. (1952a) Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol* **64**: 489–499.
- Talbot, N.P. and Flight, W.G. (2016) Severe *Achromobacter xylosoxidans* infection and loss of sputum bacterial diversity in an adult patient with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **20 Suppl**: 27–29.
- Tandara, L. and Salamunic, I. (2012) Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochem Medica* **22**: 311–328.
- Tetart, M., Wallet, F., Kyheng, M., Leroy, S., Perez, T., Le Rouzic, O., et al. (2019) Impact of *Achromobacter xylosoxidans* isolation on the respiratory function of adult patients with cystic fibrosis. *ERJ Open Res* **5**: 00051–02019.
- Thanabalasuriar, A., Surewaard, B.G., Willson, M.E., Neupane, A.S., Stover, C.K., Warrener, P., et al. (2017) Bispecific antibody targets multiple *Pseudomonas aeruginosa* evasion mechanisms in the lung vasculature. *J Clin Invest* **127**: 2249–2261.
- Tostado-Islas, O., Mendoza-Ortiz, A., Ramírez-García, G., Cabrera-Takane, I.D., Loarca, D., Pérez-González, C., et al. (2021) Iron limitation by transferrin promotes simultaneous cheating of pyoverdine and exoprotease in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* **15**: 2379–2389.
- Traverse, C.C., Mayo-Smith, L.M., Poltak, S.R., and Cooper, V.S. (2013) Tangled bank of experimentally evolved *Burkholderia* biofilms reflects selection during chronic infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E250–259.

- Trejo-Hernández, A., Andrade-Domínguez, A., Hernández, M., and Encarnación, S. (2014) Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. *ISME J* **8**: 1974–1988.
- Tseng, B.S., Zhang, W., Harrison, J.J., Quach, T.P., Song, J.L., Penterman, J., et al. (2013) The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* **15**: 2865–2878.
- Tyrrell, J., Whelan, N., Wright, C., Sá-Correia, I., McClean, S., Thomas, M., and Callaghan, M. (2015) Investigation of the multifaceted iron acquisition strategies of *Burkholderia cenocepacia*. *Biomaterials Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **28**: 367–380.
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J.-M., and Héchard, Y. (2009) delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* **30**: 817–823.
- Visca, P. and Imperi, F. (2018) An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur. *Future Microbiol* **13**: 853–856.
- Wang, Y. and Newman, D.K. (2008) Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr)oxides and molecular oxygen. *Environ Sci Technol* **42**: 2380–2386.
- Wang, Y., Wilks, J.C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., and Newman, D.K. (2011) Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* **193**: 3606–3617.
- Weinberg, E.D. (1975) Nutritional immunity: host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA* **231**: 39–41.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., et al. (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8101–8106.
- Wiens, J.R., Vasil, A.I., Schurr, M.J., and Vasil, M.L. (2014a) Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **5**: e01010-01013.
- Wiens, J.R., Vasil, A.I., Schurr, M.J., and Vasil, M.L. (2014b) Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **5**: e01010-01013.

- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., and Vasil, M.L. (2001) Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**: 5385–5394.
- Willger, S.D., Grim, S.L., Dolben, E.L., Shipunova, A., Hampton, T.H., Morrison, H.G., et al. (2014) Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* **2**: 40.
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F.E., Silva, J., et al. (2009) Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PloS One* **4**: e7370.
- Wilson, M.J. and Lamont, I.L. (2000) Characterization of an ECF sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 578–583.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., and Lewenza, S. (2016) Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 544–553.
- 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.
- Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R.W., Rochel, N., et al. (1994) Iron release from transferrin by pyoverdinin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **62**: 4021–4027.
- Wong, J.K., Ranganathan, S.C., Hart, E., and Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF) (2013) *Staphylococcus aureus* in early cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* **48**: 1151–1159.
- Wu, H.-J., Wang, A.H.-J., and Jennings, M.P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **12**: 93–101.
- Yin, C., Yang, W., Meng, J., Lv, Y., Wang, J., and Huang, B. (2017) Co-infection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in hospitalised pneumonia patients has a synergic and significant impact on clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **36**: 2231–2235.

Yun, Y., Srinivas, G., Kuenzel, S., Linnenbrink, M., Alnahas, S., Bruce, K.D., et al. (2014) Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PloS One* **9**: e113466.

Zakharkina, T., Heinzl, E., Koczulla, R.A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J.K., et al. (2013) Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS One* **8**: e68302.

Zhang, W., Sun, J., Ding, W., Lin, J., Tian, R., Lu, L., et al. (2015) Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Front Cell Infect Microbiol* **5**: 40.

Annexes

Contributions dans d'autres publications scientifiques

Article 1

Titre de la publication : Non-specific interference of cobalt with siderophore-dependent iron uptake pathways

Auteurs : Carballido-Lopez A., Cunrath O., Forster A., Pérard J., Graulier G., Legendre R., Varet H., Sismeiro O., Perraud Q., Pesset B., Saint-Auguste P., Bumann D., Mislin G. L. A., Coppee JY., Michaud-Soret I., Fechter P., Schalk I. J.

Publié en 2019 dans *Metallomics*

Résumé : De nombreuses données montrent que des métaux biologiques autres que le fer(III) peuvent interférer avec l'acquisition du fer(III) par les sidérophores chez les bactéries. Les sidérophores sont de petits chélateurs du fer(III) produits par le microorganisme pour accéder au fer. Ici, nous montrons que le cobalt(II) est importé dans les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* sous forme complexe avec le sidérophore pyochéline (PCH) par le transporteur FptA de la membrane externe. De plus, la présence de cobalt(II) dans l'environnement bactérien affecte fortement la production de PCH. Des approches protéomiques et transcriptomiques ont montré qu'une diminution de la production de PCH est associée à une répression de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PCH. Nous avons utilisé diverses approches de biologie moléculaire pour montrer que cette répression n'est pas Fur dépendante (régulateur transcriptionnel de l'absorption du fer) mais qu'elle est due à la compétition du complexe PCH-Co avec le complexe PCH-Fe pour la liaison à PchR (activateur transcriptionnel de la voie PCH), inhibant ainsi la formation du complexe PchR-PCH-Fe et par conséquent l'expression des gènes de la voie PCH. Nous avons observé un mécanisme similaire de répression de la production de PCH, mais dans une moindre mesure, par le nickel(II), mais pas pour le zinc(II), le cuivre(II), ou le manganèse(II). Nous montrons ici, pour la première fois au niveau moléculaire, comment la présence d'un métal contaminant peut interférer avec la production de PCH et ainsi interférer avec l'acquisition de fer(III) par les sidérophores PCH et PVD.

Ma contribution : Pour cette étude j'ai réalisé des suivis de l'expression des différents gènes de la voie PCH en présence de différents métaux durant la croissance grâce à différents mutants contenant des tags fluorescents.

Titre de la publication : Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*

Auteurs : Perraud Q., Kuhn L., Fritsch S., Graulier G., Gasser V., Normant V., Hammann P., Schalk I. J.

Publié en 2020 dans *Environmental microbiology*

Résumé : Le fer est un nutriment essentiel à la croissance bactérienne et est à l'origine d'une lutte acharnée entre l'agent pathogène et l'hôte pendant l'infection. Les bactéries ont développé plusieurs stratégies pour accéder au fer de l'hôte, la plus courante étant la production de sidérophores, de petites molécules chélatrices de fer sécrétées dans l'environnement bactérien. Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* produit deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline, et est également capable d'utiliser une large panoplie de xénosidérophores, des sidérophores produits par d'autres microorganismes. Nous démontrons ici que les neurotransmetteurs catécholamines (dopamine, L-DOPA, épinéphrine et norépinéphrine) sont capables de chélater le fer et de le faire pénétrer efficacement dans les cellules de *P. aeruginosa* via des transporteurs TonB-Dépendants (TBDT). Des essais de croissance bactérienne dans des conditions de forte restriction en fer et avec de nombreux mutants ont montré que les TBDTs impliqués sont PiuA et PirA. PiuA a montré une spécificité plus prononcée pour l'absorption de la dopamine que pour la norépinéphrine, l'épinéphrine et la L-DOPA, tandis que la spécificité de PirA semble être plus élevée pour la L-DOPA et la norépinéphrine. Des approches protéomiques et qRT-PCR ont montré que la transcription et l'expression de PirA était induite en présence des quatre catécholamines. Enfin, les propriétés oxydatives des catécholamines leur permettent de réduire le fer, et nous avons observé une absorption du fer ferreux via le système FeoABC en présence de L-DOPA.

Ma contribution : J'ai réalisé une partie des mutants de délétion utilisés dans cette étude et j'ai également contribué aux données obtenues par expériences de transport de fer⁵⁵.

Titre de la publication : Emergence of quinolone resistance and expression of SmeVWX RND efflux pump in *Stenotrophomonas maltophilia* PierC1 under exposure to sub-lethal concentration of nickel

Auteurs : Chauviat A.*, Graulier G.*, Nazaret S., Favre-Bonté S.

En finalisation pour soumission dans *Journal of antimicrobial Chemotherapy*

Résumé : Objectifs : Comprendre l'impact de l'exposition successive de *Stenotrophomonas maltophilia* à des concentrations sublétales de nickel sur l'émergence du phénotype de résistance aux antibiotiques et l'association avec l'expression des pompes d'efflux.

Méthodes : La souche environnementale *S. maltophilia* PierC1 a été soumise à une exposition répétée pendant 30 jours à des concentrations sublétales de NiCl₂. Le phénotype de résistance aux antibiotiques de la population a été évalué par la méthode du disque de diffusion en gélose au cours de l'évolution. Le niveau d'expression des pompes d'efflux RND a été déterminé par RT-qPCR.

Résultats : Une augmentation du nombre de colonies résistantes aux quinolones (CMI > 2 mg/L et CMI > 4 mg/L pour la ciprofloxacine et la péfloxacine respectivement) et une surexpression de la pompe d'efflux RND SmeVWX suite à l'exposition à une concentration sub-MIC de NiCl₂ ont été observées pour la souche *S. maltophilia* PierC1.

Conclusions : L'exposition répétée à une concentration sublétale de NiCl₂ induit une surexpression de la pompe d'efflux SmeVWX RND et conduit potentiellement à l'émergence d'une résistance à la ciprofloxacine et à la péfloxacine.

Ma contribution : J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations de ce travail lors de mon stage de master 2.

Monitorat

J'ai eu l'opportunité en première et seconde année de thèse d'effectuer une mission de monitorat au sein de l'Université de Strasbourg. Au cours de cette mission de 64 h/an j'ai eu la chance de participer à l'Unité d'Enseignement (UE) « Techniques biologiques » en première année de licence de Biologie à la faculté des Sciences de la Vie.

Durant cette mission j'eus la charge du suivi de groupes d'étudiants au cours de tout leur semestre au sein de cette matière en Travaux Dirigés et Travaux Pratiques. L'objectif de cet enseignement était de leur apprendre les bases de la manipulation en biologie avec l'apprentissage de différentes techniques microbiologiques telles que les observations micro/macrosopiques de bactéries, le suivi de croissance, l'utilisation de plasmides, l'analyse d'ADN et l'utilisation de la technique immunologiques ELISA.

J'étais chargée en Travaux Dirigés de préparer les étudiants à leurs futures manipulations mais aussi à l'interprétation de leurs résultats et en Travaux Pratiques de les guider dans leurs expériences. J'ai également été responsable du contrôle continu de mes groupes d'étudiants et j'ai aussi participé à leur évaluation finale ainsi qu'au passage d'un petit oral. Cette UE étant très conviviale et organisée comme une véritable équipe j'ai également participé à la préparation commune de certains des matériels nécessaires aux Travaux Pratiques de l'ensemble de l'UE.

Enseigner m'a permis de devenir bien plus à l'aise à l'oral, de gagner beaucoup de confiance en moi grâce aux retours positifs que j'ai pu avoir et de développer ma vulgarisation et ma communication en devant adapter mon discours et répondre à des questions spontanées auxquelles je n'étais pas préparée. Cette expérience fut un réel plaisir et un grand enrichissement aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel.

Communications sur le projet de thèse

Publications

Cunrath O., Graulier G., Carballido-Lopez A., Pérard J., Forster A., Geoffroy V. A., Saint Auguste P., Bumann D., Mislin G. L. A., Michaud-Soret I., Schalk I. J., Fechter P. (2020) The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges. *Metallomics*

Forster A., **Graulier G.**, Cramer N., Schalk I.J., Fechter P. (en finalisation pour soumission) Importance and fine tuning of pyoverdine production in intra versus inter specific competition.

* : les auteurs ont contribué à parts égales

Communications orales

Graulier G., Janel R., Forster A., Cramer N., Tümmeler B., Doleans-Jordheim A., Schalk I.J., Fechter P. Etude de la formation de communauté de pathogènes et de l'importance de l'import du fer. Colloque Pseudomonas 2021 (18-19 octobre 2021)

Graulier G., Janel R., Forster A., Cramer N., Tümmeler B., Doleans-Jordheim A., Schalk I.J., Fechter P. Etude du rôle et de l'évolution de la production de sidérophores sur l'interaction entre *Pseudomonas aeruginosa* et différents pathogènes dans le contexte de la mucoviscidose. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (24 mars 2022)

Communication par affiche

Graulier G., Schalk I.J., Fechter P. Importance des voies d'import du fer dans la résistance aux antibiotiques. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (28 mars 2019)

Gwenaëlle GRAULIER

Etude du rôle et de l'évolution de la production de sidérophores sur l'interaction entre *Pseudomonas aeruginosa* et différents pathogènes dans le contexte de la mucoviscidose

Résumé

Afin de mieux lutter contre les infections bactériennes dans le cadre des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de mucoviscidose, il est important de mieux comprendre les interactions entre pathogènes. Nous nous sommes intéressés aux interactions entre *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène infectant de manière chronique les patients atteints de mucoviscidose, et d'autres pathogènes retrouvés chez ces patients au travers de la bataille que ces bactéries se livrent pour l'approvisionnement en fer. Le fer est un élément clé pour la croissance bactérienne, mais il est très peu biodisponible dans les fluides de l'hôte. Les bactéries produisent alors des sidérophores pour lier le fer dans le milieu extracellulaire et permettre son import dans la bactérie. *P. aeruginosa* produit deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline. Au cours de l'infection chronique à *P. aeruginosa*, la production de ces sidérophores varie, en même temps que la virulence des souches. Afin de mieux discerner l'importance des sidérophores dans l'import en fer et dans ces mécanismes de virulence, nous avons étudié les interactions entre des isolats de *P. aeruginosa* issus d'un patient unique, mais prélevé à différents temps de l'infection chronique et 5 autres pathogènes. Nous avons d'abord mieux caractérisé la régulation de la production de pyochéline, moins bien étudiée, puis développé un outil pour différencier des bactéries en co-cultures grâce à un marqueur fluorescent. Nous avons ainsi pu mieux spécifier l'importance de ces sidérophores en tant que facteurs de virulence et en tant que facteur d'import du fer. La baisse de leur production au cours de l'infection chronique permet aux autres bactéries de mieux proliférer et à des interactions bactériennes de s'établir. Enfin, nous avons également établi un lien entre certains traitements antibiotiques, récurrents chez ces patients, et l'évolution de la production de sidérophores chez *P. aeruginosa*.

Mots clés : Fer, *Pseudomonas aeruginosa*, Infection chronique, Sidérophores, Interactions, Antibiotiques

Abstract

To better understand bacterial infections in the context of pulmonary infections in cystic fibrosis patients, it is important to better understand the interactions between pathogens. We looked at the interactions between *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen that chronically infects cystic fibrosis patients, and other pathogens found in cystic fibrosis patients through the battle between these bacteria for iron supply. Iron is a key element for bacterial growth, but it is very poorly bioavailable in host fluids. The bacteria then produce siderophores to bind iron in the extracellular medium and allow its import into the bacteria. *P. aeruginosa* produces two siderophores, pyoverdine and pyochelin. During chronic *P. aeruginosa* infection, the production of these siderophores varies, along with the virulence of the strains. To better understand the importance of siderophores for iron import and for these virulence mechanisms, we studied the interactions between *P. aeruginosa* isolates from a single patient, but collected at different times during chronic infection, and 5 other pathogens. We first better characterised the regulation of pyochelin production, which is less well studied, and then developed a tool to differentiate the bacteria in these co-cultures using a fluorescent marker. We were thus able to better specify the importance of these siderophores as virulence factors and as iron import factors. The decrease in their production during chronic infection allows other bacteria to proliferate better and bacterial interactions to be established. Finally, we also established a link between certain antibiotic treatments, recurrent in these patients, and the evolution of siderophore production in *P. aeruginosa*.

Keywords: Iron, *Pseudomonas aeruginosa*, Chronic infection, Siderophores, Interactions, Antibiotics