



HAL
open science

Vers la compréhension du rôle de SigX dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *Pseudomonas aeruginosa*

Damien Tortuel

► **To cite this version:**

Damien Tortuel. Vers la compréhension du rôle de SigX dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *Pseudomonas aeruginosa*. Bactériologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR002 . tel-03962085

HAL Id: tel-03962085

<https://theses.hal.science/tel-03962085>

Submitted on 30 Jan 2023

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Vers la compréhension du rôle de SigX dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *Pseudomonas aeruginosa*

**Présentée et soutenue par
Damien TORTUEL**

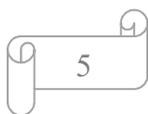
**Thèse soutenue publiquement le 29 janvier 2020
devant le jury composé de**

Mme. Emmanuelle BOUVERET	Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Paris	Rapporteur
M. Jean-François COLLET	Professeur des Universités, Institut de Duve, Bruxelles	Rapporteur
M. Alain DUFOUR	Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud	Examineur
M. Christophe BORDI	Professeur des Universités, Université d'Aix-Marseille	Examineur
M. Laurent DEBARBIEUX	Directeur de Recherche, Institut Pasteur de Paris	Examineur
Mme. Nicole ORANGE	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme. Emeline BOUFFARTIGUES-MAILLOT	Maître de Conférences, Université de Rouen Normandie	Co-encadrante de thèse
Mme. Sylvie CHEVALIER-LAURENCY	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par Sylvie CHEVALIER-LAURENCY, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312



A ma famille, à mon amour



Remerciements

La vie est pleine de surprises. De choix, aussi. Que ferais-je aujourd'hui si cette personne ne m'avait pas vanté les mérites de ce DUT Génie Biologie lorsque j'étais en Terminale ? Aucune idée. Je sais simplement que je suis à la fin de ce Doctorat en Microbiologie aujourd'hui parce que cette personne a eu l'idée de m'en parler à un moment de ma vie où je ne savais pas quoi faire de mon avenir. Ma passion pour la Météorologie m'avait toujours guidé dans mes choix, et m'avais amené jusqu'en Terminale S. Mais lorsque l'on finit par comprendre que cette voie est beaucoup trop complexe pour soi et que l'on ne pourra continuer sa passion qu'en simple dilettante, l'avenir professionnel devient vraiment secondaire. Je ne la remercierai jamais assez, car j'y ai découvert la Microbiologie, et j'y ai également connu la personne qui est encore à mes côtés aujourd'hui, plus de huit ans après. Quand j'y pense, à cette personne, un sourire fugace et légèrement amer me barre le visage : nous n'avons plus aucun contact depuis neuf années.

Assez parlé de moi. Etrangement, cette partie de la thèse est la plus personnelle, et également celle où l'on passe son temps à remercier les autres. Nous avons beau nous dire que nous traçons notre propre avenir, nous nous rendons vite compte que cet avenir dépend majoritairement de personnes que nous rencontrons, que nous croisons, et que nous fréquentons au quotidien.

Pour cette dernière raison, je voudrais commencer par remercier mes deux « chefs-chefs », qui m'ont tant appris, tant soutenu au quotidien, et qui m'ont tant motivé à poursuivre mes efforts chaque jour, sans relâche, avec la même passion du début à la fin. **Emeline, Sylvie**, merci. Le mot est simple, mais l'intention, puissante. Merci de m'avoir pris en stage de M2, et de m'avoir sélectionné pour la thèse. Votre dévouement et votre enthousiasme envers mon travail et mon apprentissage du métier de chercheur, bien que submergées de travail, est inqualifiable. A chaque fois que je me sentais perdu, débordé, ou déboussolé, vous avez largement su, à chaque fois, me remotiver. Je ne vous remercierais jamais assez pour tout : la formation, les bons moments, les réunions, les pauses café et les éclats de rire. Ah, et vous avez beau me dire que vous n'êtes pas mes chefs... Vous serez TOUJOURS mes chefs. Toujours. Tant pis si ça vous déplaît.

Une autre personne que je dois remercier : **Marc**. Merci de m'avoir accepté au sein de ton labo, merci pour m'avoir fait confiance toutes ces années. Merci pour ces moments détente lors des

pauses café. Ton goût pour la bonne chère m'aura marqué. Tes anecdotes sur ta jeunesse racontées dans notre bureau, à Mélyssa et moi, aussi. Et quand Sylvie est également présente, alors là... On savait qu'on en avait pour une heure. Mais une heure de franche rigolade, alors merci pour ça. Ah, et j'ai retenu une chose très importante : le croco, c'est pas bon.

Merci également aux membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur, et ont accepté de prendre de leur temps pour juger mon travail. Merci **Emmanuelle** et **Jean-François** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. C'est un travail supplémentaire pour vous, mais un honneur pour moi. Merci également à **Christophe**, pour avoir d'abord accepté de faire parti de mon CSI, puis, finalement, de mon jury de thèse en tant qu'examineur. Merci également à **Alain** et à **Laurent** d'avoir accepté ce rôle d'examineur. **Nicole**, je te remercie également d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse. J'espère que tu apprécieras la retraite..!

Pas de financement, pas de thèse. Ainsi, je remercie la région Normandie d'avoir financé mes trois années de thèse, et les différents pourvoyeurs de fonds du projet Orgapathop d'avoir financé mes manip. La recherche, ça coûte cher, alors n'oublions pas ceux sans qui ce Doctorat n'aurait pas eu lieu.

Passons maintenant aux membres du labo. **Olivier, Maillot, Mailloli**... Je n'ai pas tous les surnoms qui me viennent en tête, mais sache que tu seras toujours pour moi le super-technicien, un peu magicien, qui fait fonctionner des trucs avec des moyens improbables. Le nombre de fois où je t'ai dit : Maillloooooot t'es oùùùùùù ?? Ça marche paaaaaaas !!! J'en rigole tout seul devant mon écran d'ailleurs, tiens. Ton caractère est légendaire, mais ne change rien, surtout : tu es génial comme ça. Ton dévouement pour nous, thésards et post-doc... Je ne l'oublierai jamais. Ta musique non plus d'ailleurs, mais pas pour les mêmes raisons... J'en saigne encore des oreilles. J'oubliais, mais tes têtes de pervers-psychopathe m'auront grandement marqué aussi. Finalement, j'en viens à penser que ça me manquera quand même un peu (beaucoup ?) ces prochaines années.

Un autre **Olivier** maintenant, mais lui est plus le maître ès vers incontestable et incontesté. Merci pour tous ces bons moments, réunions, temps pris pour les manips *C. elegans* ou la relecture des papiers. Tes points de vue m'auront été précieux, et ton enthousiasme constant pour mon travail, très agréable. Merci pour tout. Et merci pour la découverte de tous ces jeux de société ! A quand la prochaine partie de White Chapel ??

Coco, merci pour toutes ces discussions, échanges de point de vue et débats autour de la Bio Mol. Je crois que tu es une des personnes les plus altruistes que j'ai rencontré dans ma vie. Une personne formidable, tu es géniale !!

Annabelle, merci aussi pour les moments discussions, conseils, échanges et débats autour de la Bio Mol. Je n'oublierais jamais que c'est toi qui m'as fait découvrir et adorer ce champ de la Biologie en DUT !

Pierre, merci beaucoup pour l'ensemble de ton implication dans mon travail, les réunions, les relectures, corrections et autres amendements des articles. Je garde aussi en tête les petites bières au Seven !! Merci pour tout !

Une pensée également aux autres permanents du labo : **Amandine, Magalie, Pierre-Jean, Cécile, Anne, Xavier, Nathalie, Amine, Chloé, Yoann...** Et tout ceux que j'ai oublié. Merci pour avoir rendu la thèse plus agréable.

Une des chances extraordinaires de ce labo, c'est finalement son équipe de thésards et post-docs. Un Doctorat reste une expérience forte, une étape inoubliable, tant par les joies qu'il procure, que par la démotivation à laquelle il peut parfois nous soumettre. Et finalement, qui, mieux que des personnes subissant les mêmes choses, peut offrir autant de soutien ? On commence par se côtoyer, se fréquenter, et puis on finit par s'apprécier et devenir copains.

Commençons par les post-docs... **Ali**, mon ami ! J'ai bien essayé de lister tout ce que j'avais à te dire, mais finalement, j'ai abandonné. Je vais écrire simplement, au fil de mes pensées. Par quoi commencer ? Tu es devenu quelqu'un que j'apprécie énormément, de par ton côté scientifique, humain, ou encore de par ta personnalité. Tu es un peu mon pilier, mon phare et mon plus fidèle soutien dans notre groupe de travail. Je suis super content de t'avoir fait découvrir une partie de la gastronomie française (je crois que tu te souviendras longtemps de la fondue savoyarde...), et certaines expressions françaises assez... Intéressantes. Merci pour tes sorties mémorables, « c'est cookie », « cimenterie » et autre « je suis entré en colère ». Ça restera longtemps dans ma mémoire. Je garde également le super souvenir du congrès à Glasgow. J'espère de tout cœur que toi, le fan du Barça, décrocheras bientôt un poste fixe.

Sophie, Soso, T-Rex, la « truelche » ou le « ménache » vont me manquer. Tu pars en même temps que l'on finit nos thèses, Mélyssa et moi et pourtant, ça réussit quand même à me rendre triste. Merci pour tout ce que tu as fait pour elle, déjà. Et merci pour tous nos délires / conversations / discussions sérieuses / discussions ennuyantes (rayer la mention inutile). Je

crois que je me souviendrais toujours de ta tête quand je t'avais sorti « ça me serre le kiki ». J'en re-rigole tout seul, tiens. Merci aussi pour ces moments en dehors du labo, ces petits repas ensemble. Bonne chance pour la suite en Bretagne, et bon vent... On se reverra incessamment sous peu, je pense : on s'est déjà planifié un week-end en Bretagne...

Enfin, **Florie**, on a moins eu le temps de se connaître, mais je n'ai pas oublié nos conversations plus ou moins sérieuses pendant ces quelques mois où tu étais dans le labo.

Les thésards, maintenant... **Mathias**, gros sacos, tu me manques beaucoup ! Je n'oublie pas la multitude de bêtises, de délires et de craquages qu'on a pu avoir ensemble (surtout le vendredi soir...). Entre « Stana », « Mikiiiiit » et autres « Pas la cocotte-moineau ! », j'ai frisé plusieurs fois la mort par asphyxie, à force de rire. On se retrouvera sûrement un jour, pour le meilleur !!

Thomas, je suis tellement triste que plus personne ne me cache mon flamand rose ! Le truc qui m'a le plus marqué je crois, c'est ton rire... Ton vrai rire, le rire de démon que tu as quand tu n'as plus... d'inhibitions, on va dire (tu as vu ? Je suis resté soft). Je crois que ne plus voir personne faire la sieste dans ton bureau me manque aussi. Bref, je deviens sentimental, je vais en rester là.

Maxou et **Boutbout**, les inséparables. Je voulais vous faire un paragraphe chacun, mais j'ai repensé à cette fois dans le labo où Maxou te suivait absolument partout où tu allais. Il avait fini par te perdre et il demandait partout : « Elle est où Boobie ? Vous n'avez pas vu Mathilde ?? ». Il avait l'air tellement perdu, le pauvre. Et du coup je me suis dit que c'était difficile de vous dissocier. Merci pour tout, les (nombreux) moments détente, délires et autres discussions absolument pas sérieuses dans notre bureau, avec Mélyssa. Merci pour le congrès à Glasgow, ça n'aurait pas eu la même saveur sans vous. Déjà, on ne serait pas reparti avec un petit nuage, on n'aurait pas eu l'histoire d'un dentier ni les soucis de compréhension des écossais : « Marbowo Red ? » ou encore « FOOORTH » (avec plein de postillons associés). Vous êtes géniaux, ne changez pas.

Djoudjou, aaaah, Djoudjou... Merci pour les nombreux moments détente et les discussions en pause café. On est arrivé ensemble en M2, finalement, mais tu finiras ta thèse plus tard. Quand je pense que tu me disais « Jamais de la vie, je ne ferais une thèse ». Comme quoi, tout change !

Xavier, merci pour toutes ces discussions sur les jeux vidéos, et de m'avoir fait découvrir la franchise des Mass Effect !! Merci pour les moments détente / pause dans notre bureau. Prends bien soin de ta petite.

Ségogo, wolololo ! Beaucoup de souvenirs, les soirées geek chez toi, les pizzas maison et les barbecues. Je te souhaite une bonne continuation.

Valérie, pour ces nombreuses soirées ensemble, raclette, fondues et j'en passe... Merci !

Thibaut, notre « service info » !! Ton art des scuds force mon admiration, merci pour ces souvenirs !

Andréa, Awa, Cecil, je ne vous oublie pas. Merci pour tous ces moments, soirées partagées, discussions improvisées et autres pauses café.

Enfin, les p'tits nouveaux, **Vanvan** et **Dédé**. Bonne chance pour la thèse, mais je sais que vous allez gérer. **Yvann**, le fana du sport et maître-mojito en chef, je n'oublie pas ta manière... Intéressante de faire de la glace pilée !! Merci pour les (déjà) nombreux moments délires passés ensemble ! **Dédé**, ma successeuse. Bon j'admets, quand j'ai vu ton niveau en cuisine, ça partait mal, c't'affaire, quand même. Mais bon, quand j'ai vu que je pouvais te martyriser avec la balle rebondissante, mon horizon s'est subitement illuminé, et j'ai décidé de te garder dans le bureau. Grand bien m'en fasse, j'ai découvert une belle personne, un peu caractérielle, certes, mais juste de ce qu'il faut. On a beau dire, même au bout de la thèse, on rencontre encore des nouvelles personnes avec qui on s'entend bien. Merci pour tous les délires et après-midi... Productifs, lors de l'écriture de la thèse. Je la termine, d'ailleurs, cette thèse, sans crainte aucune : le sujet est entre d'excellentes mains. Bon courage, l'avenir t'appartient. Chouquette te suivra sur la route du succès !!

Mélessande, miss dada, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, tu es quelqu'un de très agréable et sympathique. Au moins, quand on vient te voir, on sait qu'on passera un bon moment. C'est quelque chose de précieux, ne change rien. Courage ! Tu finiras par l'avoir, ce sujet de thèse !

Petit clin d'œil à **Flore** aussi, stagiaire qui m'aura beaucoup marqué. J'espère que tu trouveras rapidement ta voie !

Parce qu'il y a une vie en dehors de la thèse, mes derniers mots iront à mes proches. Les potos, pour commencer... **Josh** et **Floflo**, promis, juré, dès qu'on a soutenu, on sort de notre tanière et on vient vous voir. Merci pour tous ces p'tits week-ends, ces soirées, ces nombreux délires... Josh mon frerot, des bisous... Tu sais bien où, ne fais pas l'innocent, va.

Alex, mon sac à vin, on vient te voir à Lyon dès que possible. Bien trop de souvenirs ensemble, pas besoin de les réécrire ici... ça prendrait bien trop de pages. Simplement, merci pour tout,

depuis le moment où on s'est connu jusqu'à maintenant (déjà 12 ans... #coupdevieux). Pas besoin d'en dire plus.

La famille, pour finir. **P'pa, M'man**, merci. Pour tout. De m'avoir poussé à aller au bout de tout ce que j'entreprenais, de m'avoir soutenu pour tout, et de vous être sacrifié pour que je puisse réussir et faire ce qui me plaisait. Je ne vous le dis sûrement pas assez, mais vous êtes des parents géniaux. Ne changez rien, je vous aime.

Papi, Tinou, Ingrid, Kiki, Isa, et les **quatre morveux** (oui oui, c'est de vous que je parle mes cousin(e)s), merci pour tous les repas de famille, les éclats de rire et les bons moments. Je vous aime aussi.

Enfin, je n'oublie pas **Mimi, Patrick** (merci pour les photos, elles sont magnifiques), **Lise, Phiphi, Marie, Fanfan**, et puis évidemment **Jean-Pierre**, décédé il y a quelques mois, et parti bien trop vite. Beaucoup de souvenirs de vacances me reviennent en tête, les randos en montagne, et mon apprentissage du tarot, que je lui dois, avec Fanfan et Papi. Je pense fort à vous tous, et plus spécialement à toi, **Jean-Pierre**. Repose en paix.

Ma belle-famille, devenue également ma famille. **Evelyne**, merci pour tous ces repas le vendredi soir, ces nouvelles recettes testées et ta bonne humeur. Petit clin d'œil à **Thierry**, pour ta bonne humeur et tes blagues. Ta terrasse se porte bien, j'espère, j'en ai encore mal aux bras !! **Maëva**, ma petite-sœur d'adoption (on va encore plus s'entendre si tu commences à aimer le vin, maintenant...), et **Timothée**, le « p'tit nouveau », qui n'est plus si nouveau que ça, maintenant. Je retiens le check, on réussira à te faire passer totalement du côté obscur de la force. Vous formez un beau couple, j'espère que ça continuera longtemps. **Juju**, ma sacos, que de bons fous rire avec toi. **Nico, Nonore, Tiago**, vous formez une belle petite famille, j'espère vous voir bientôt. Bisous à tout le monde.

Et enfin la meilleure pour la fin, celle qui partage ma vie depuis huit années. On a commencé cette histoire par de l'amitié, et insidieusement, un regard, et l'amour entre dans ta vie sans le savoir. J'aurais tant de choses à dire, je ne sais pas par quoi commencer. On a survécu à tout pour le moment, les études, les galères, la thèse. Huit ans de bonheur, et ce n'est que le début. On va pouvoir commencer à penser à faire des mini-nous, maintenant... Il faut juste qu'on se mette au point sur les prénoms, ce n'est pas encore gagné. Et voyager aussi... La Grèce n'était qu'un début, beaucoup d'autres pays nous attendent. Mordons la vie à pleine dents ; profitons, tant qu'il en est encore temps.

Sommaire

Remerciements.....	7
Sommaire.....	19
Liste des figures.....	25
Liste des tableaux.....	29
Liste des abréviations.....	31
Introduction.....	33
I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
1. Un modèle d'adaptation.....	33
2. Bases moléculaires de la virulence.....	35
a. Infections aiguës.....	35
b. Infections chroniques.....	45
c. Transition entre mode de vie planctonique et mode de vie sessile.....	59
3. Prophages et structures phagiques cryptiques.....	65
a. Bactériophages.....	65
b. Structures phagiques cryptiques.....	69
c. Prophages Pfl-like.....	73
II. Enveloppe de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
1. Structure et fonction.....	83
a. Membrane externe.....	83
b. Périplasme.....	95
c. Membrane interne.....	97
2. Morphologie et division cellulaire.....	99
3. Stress d'enveloppe.....	103
a. Stress chimique et biologique.....	103
b. Stress mécanique.....	105
4. Réponse aux stress d'enveloppe.....	107
a. Facteurs sigma à fonction extra-cytoplasmique.....	109
b. Systèmes à deux composants.....	115
c. Canaux mécanosensibles.....	123
d. Environnement génomique de sigX.....	135
Objectifs de thèse.....	141
Résultats.....	145
I. Recherche de nouveaux régulateurs et conditions régulatrices de l'expression et/ou de l'activité de SigX145	
1. Caractérisation d'un mutant surproduisant le Pf4.....	145
a. Résultats.....	145
b. Discussion.....	163
2. L'infection par les phages Pf4 induit une réponse au stress d'enveloppe chez <i>P. aeruginosa</i>	173
3. L'infection par les phages Pf4 conduit à la diminution de la virulence de <i>P. aeruginosa</i>	177
a. Article.....	177

b.	Résultats complémentaires	179
4.	Conclusion	181
II.	Fonctions cellulaires et liens régulationnels entre les membres du système CmaX-CfrX-CmpX et SigX. 183	
1.	Introduction.....	183
2.	La régulation par la température de l'opéron <i>cmaX-cfrX-cmpX</i> chez <i>P. aeruginosa</i> implique les facteurs σ AlgU et SigX, et le régulateur AmrZ.....	185
3.	Rôle du canal mécanosensible CmpX en phase stationnaire de croissance dans l'homéostasie de l'enveloppe chez <i>P. aeruginosa</i>	187
a.	Résultats	189
b.	Discussion	199
4.	Conclusion	201
	Discussion	203
1.	Une souche énigmatique surproduisant des phages Pf4.....	205
2.	Une infection exogène par le phage Pf4 active les réponses de type « SOS », « stress d'enveloppe » et peut-être la réponse aux « contraintes de cisaillement » chez <i>P. aeruginosa</i>	211
a.	Réponse au stress d'enveloppe et réponse SOS	211
b.	Impact sur la virulence, la voie Chp/Vfr et contraintes de cisaillement	219
c.	Comparaison des réponses entre la souche dH103Pf4 ⁺ et l'ajout exogène par les phages Pf4 superinfectifs.....	225
d.	Comparaison de la réponse bactérienne entre le mutant $\Delta oprF$ et l'infection par les phages Pf4 superinfectifs.....	227
e.	Condition qui active fortement SigX : vers la découverte du signal activant SigX ?	229
3.	Vers la compréhension du système SigX-CfrX-CmpX	231
	Conclusion – Perspectives.....	239
	Matériel et Méthodes	247
I.	Matériels.....	247
1.	Souches, milieux et conditions de culture.....	247
2.	Plasmides et amorces	249
II.	Méthodes	251
1.	Techniques microbiologiques	251
a.	Mobilité bactérienne.....	251
b.	Formation de biofilm.....	253
c.	Test de sensibilité aux phages	255
d.	Dosage des HSL	255
e.	Dosages des facteurs de virulence.....	257
f.	Cytométrie en flux.....	259
2.	Tests de virulence	261
a.	Cytotoxicité sur lignée cellulaire A549.....	261
b.	Virulence sur modèle <i>C. elegans</i>	263
3.	Techniques de microscopie.....	265
a.	Microscopie confocale à balayage laser	265
b.	Microscopie électronique	265
4.	Techniques biochimiques	267
a.	Anisotropie de fluorescence	267

b.	Extraction des protéines de membrane externe	269
c.	Electrophorèse bi-dimensionnelle	269
d.	Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF	271
e.	Extraction et analyse de la composition lipidique des membranes	271
5.	Techniques de biologie moléculaire	273
a.	Extraction des acides nucléiques	273
b.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	277
c.	Rétro-transcription	279
d.	PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	279
e.	RACE-PCR	279
f.	Clonage	281
g.	Fusions transcriptionnelles	283
h.	Mutation par délétion	283
i.	Construction de la banque de mutants par transposition aléatoire.....	283
j.	Localisation du transposon dans les mutants.....	287
k.	Séquençage de génome entier	289
6.	Statistiques.....	289
	Références bibliographiques	291
	Annexes.....	317
I.	Annexe 1. The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	317
II.	Annexe 2. Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tobramycin-enhanced biofilm formation.....	319
III.	Annexe 3. Membrane-Interactive Compounds from <i>Pistacia lentiscus</i> L. Thwart <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Virulence.....	321
IV.	Annexe 4. Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> H103.....	323
V.	Annexe 5. <i>Curriculum vitae</i> et liste des communications.	325

Liste des figures

Figure 1. Bases moléculaires de la virulence aigüe.	34
Figure 2. Modèle de formation de biofilms chez <i>P. aeruginosa</i>	46
Figure 3. Régulation de la production de Pel.	50
Figure 4. Régulation de la production de Psl.	52
Figure 5. Régulation de la synthèse des alginates.	54
Figure 6. Facteurs liés à la dispersion du biofilm.	58
Figure 7. Bases moléculaires de la transition entre les modes de vie planctonique et sessile.	60
Figure 8. Morphologie des bactériophages, classés selon leur famille.	66
Figure 9. Homologies structurales entre le phage T4 et le système de sécrétion de type VI... ..	68
Figure 10. Relations entre les prophages Pfl-like et les souches bactériennes sur lesquelles ils sont retrouvés.	72
Figure 11. Organisation génomique du prophage Pf4.	74
Figure 12. Structure, transport et modification du LPS de <i>P. aeruginosa</i>	82
Figure 13. Modèle du système de signalisation de surface de Koebnik.	88
Figure 14. Conformations d'OprF.	92
Figure 15. Représentation schématique de la structure du peptidoglycane.	96
Figure 16. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des acides gras chez <i>P. aeruginosa</i>	98
Figure 17. Morphologie et division cellulaire.	100
Figure 18. Systèmes de réponse au stress d'enveloppe chez <i>E. coli</i>	106
Figure 19. Structure des facteurs sigma des groupes I et IV (ECF).	110
Figure 20. Conditions d'activité, régulation et grandes fonctions de SigX.	112
Figure 21. Représentation schématique d'un système à deux composants.	114
Figure 22. Systèmes à deux composants impliqués dans la réponse au stress d'enveloppe chez <i>P. aeruginosa</i>	116
Figure 23. Conformations d'un canal mécanosensible.	122
Figure 24. Structure modélisée de MscL d' <i>E. coli</i>	126
Figure 25. Structure modélisée de MscS d' <i>E. coli</i>	128
Figure 26. Structure et insertion membranaire des domaines de différents canaux de type MscS.	130
Figure 27. Phylogénie basée sur les séquences nucléiques des gènes codant des canaux MscS.	134
Figure 28. Isolement et caractérisation d'un mutant.	146
Figure 29. La souche dH103Pf4 ⁺ subit un stress d'enveloppe médié par AlgU.	148

Figure 30. L'architecture et la morphologie cellulaire de la souche dH103Pf4 ⁺ sont altérées.	150
Figure 31. L'altération de la morphologie cellulaire s'accompagne de la surexpression de <i>mreB</i> et <i>spoT</i>	152
Figure 32. L'activité des pili de type IV est fortement diminuée chez la souche dH103Pf4 ⁺ , et la voie Chp/Vfr semble activée.	154
Figure 33. L'expression des gènes du QS et la production des HSL sont altérées chez la souche dH103Pf4 ⁺	156
Figure 34. La souche dH103Pf4 ⁺ est moins virulente.	158
Figure 35. Séquençage de la souche dH103Pf4 ⁺	160
Figure 36. Résultats complémentaires en lien avec la virulence dans la condition d'infection par les phages Pf4.	178
Figure 37. Schéma récapitulatif de l'impact de l'infection des phages Pf4 superinfectifs sur la virulence.	180
Figure 38. Homologies structurales et fonctionnelles entre CmpX de <i>P. aeruginosa</i> et MscS d' <i>E. coli</i>	188
Figure 39. Comparaison des structures tridimensionnelles de MscS d' <i>E. coli</i> et de CmpX de <i>P. aeruginosa</i>	190
Figure 40. Viabilité cellulaire de H103 et PAOPX après des chocs thermiques.	190
Figure 41. CmpX est impliqué dans la fluidité membranaire et la composition en AG en phase stationnaire de croissance.	192
Figure 42. CmpX contribue à l'intégrité de l'enveloppe et la structure des vésicules de membrane externe.	194
Figure 43. PAOPX montre une composition protéique de membrane externe altérée comparé à H103.	194
Figure 44. La porine majoritaire OprF est moins abondante et pourrait être dégradée chez PAOPX.	198
Figure 45. La mobilité de type « swarming » et la production des rhamnolipides sont altérées chez la souche PAOPX.	200
Figure 46. Schéma récapitulatif des travaux menés lors de l'infection de <i>P. aeruginosa</i> H103 par des phages Pf4 superinfectifs.	238
Figure 47. Schéma récapitulatif des conditions d'activations de SigX, les grandes fonctions régulées par ce dernier, et la régulation de son environnement génomique mis à jour.	240
Figure 48. Localisation des sondes membranaires utilisées en anisotropie de fluorescence.	266

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des régulateurs du quorum sensing.	42
Tableau 2. Liste des porines substrats-spécifiques de <i>P. aeruginosa</i> , leurs fonctions et leurs régulateurs et facteurs sigma associés.	90
Tableau 3. Exemples de stress d'enveloppe.	102
Tableau 4. Canaux mécanosensibles chez <i>P. aeruginosa</i> , et leurs homologues chez <i>E. coli</i>	132
Tableau 5. Liste de protéines de membrane externe identifiées de façon différentielle entre la souche PAOPX et H103.	196
Tableau 6. Tableau des souches utilisées dans cette étude.	246
Tableau 7. Composition des milieux utilisés dans cette étude.	248
Tableau 8. Plasmides utilisés dans cette étude.	252
Tableau 9. Amorces utilisées dans le cadre de l'effet de la température sur <i>cmaX-cfrX-cmpX</i>	252
Tableau 10. Amorces utilisées dans le cadre de la construction et l'exploitation de la banque de mutants par transposition.	254
Tableau 11. Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.	258
Tableau 12. Amorces utilisées dans la construction du mutant de délétion $\Delta cmpX$	282

Liste des abréviations

3-oxo-C₁₂-HSL : N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homosérine lactone

ADNe : ADN extracellulaire

AG : Acide gras

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNnc : ARN non codant

ATP : Adénosine triphosphate

C₄-HSL : N-butyryl-L-homosérine lactone

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

DEPC : Pyrocarbonate d'éthyle

EPS : Exopolysaccharides

Facteur σ ECF : Facteur sigma à fonction extracytoplasmique

GTP : Guanosine triphosphate

HHQ : 2-heptyl-4-quinolone

HSL : N-acyl-homosérine lactone

LPS : Lipopolysaccharides

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de bases

PE : Phosphatidyléthanolamine

PG : Phosphatidylglycérol

PLP : Protéines liant les pénicillines

(p)ppGpp : Guanosine 5'-triphosphate-3'-diphosphate

PQS : Pseudomonas Quinolone Signal : 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone

QS : Quorum Sensing

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel

SCV : Variants microcolonies

SST3 : Système de sécrétion de type III

SST6 : Système de sécrétion de type VI

TCS : Système à deux composants

UFP : Unités formant plage

Introduction

I. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Un modèle d'adaptation

Depuis sa découverte en 1882 par Carle Gessard (**Gessard, 1882**), *Pseudomonas aeruginosa* n'a cessé d'intéresser les scientifiques pour sa formidable capacité à s'adapter à tous types d'environnements. Ce bacille à Gram négatif de ciliature polaire possède en effet un métabolisme très versatile, lui permettant d'utiliser des sources de nutriments très diverses. Le premier séquençage du génome complet de cette bactérie, réalisé sur la souche PAO1, a révélé un large génome, avec 6,3 millions de paires de bases (pb), associé à un pourcentage de GC de 66,6% (**Stover et al., 2000**). Sur l'ensemble de ses 5570 cadres de lecture ouverts prédits, environ 9% codent pour des éléments régulateurs, un taux bien plus élevé que la plupart des bactéries. Cette haute proportion d'éléments régulateurs lui confère la capacité d'être un germe naturellement présent et adapté à de nombreux environnements hydro-telluriques, ainsi qu'à un large spectre d'hôtes dans le cadre d'infections, notamment chez l'Homme, chez lequel c'est un pathogène opportuniste avéré. En effet, les infections cliniques de *P. aeruginosa* sont presque toujours liées à une altération des défenses immunitaires de l'hôte (**Driscoll et al., 2007**), bien que certaines infections chez des patients immunocompétents aient déjà été décrites (**Migiyama et al., 2016**). Cette bactérie est responsable d'infections de la peau, notamment chez les grands brûlés, de pneumopathies, en particulier chez les patients placés sous assistance respiratoire, de bactériémies, d'infections urinaires, ou d'infections de la cornée (**Bassetti et al., 2018; Bodey et al., 1983**). Elle est également retrouvée dans l'arbre trachéo-bronchique des patients atteints de mucoviscidose, provoquant l'aggravation des symptômes liés à cette maladie lorsqu'elle est durablement installée (**Winnie et Cowan, 1991**). En France, cette bactérie est un enjeu majeur de sécurité sanitaire, puisqu'elle occupe la quatrième position des germes les plus retrouvés lors d'infections liées aux soins (**InVS, 2017**). De plus, elle est naturellement résistante à différents antibiotiques et antiseptiques grâce notamment à un arsenal d'enzymes de dégradation et de pompes d'efflux ainsi qu'à une capacité à former un biofilm résistant, et est également capable d'acquérir rapidement de nouvelles résistances sous pression de sélection (**Breidenstein et al., 2011; Poole, 2011**). L'ensemble de ces éléments a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à classer *Pseudomonas aeruginosa* comme priorité

Figure 1. Bases moléculaires de la virulence aigüe.

A. Régulations liées au quorum sensing. La 3-oxo-C₁₂-HSL est produite par LasI, la C4-HSL par RhlI et PQS par PqsABCD et PqsH. Ces molécules vont être diffusées passivement, soit sécrétées par efflux actif. Lorsque le quorum est atteint, ces molécules vont se fixer sur leurs régulateurs de réponse, et vont déclencher une cascade de régulation menant à la production de facteurs de virulence. Ce quorum est hiérarchisé et interconnecté : le système Las contrôle le système Rhl, et le système PQS est un modulateur de ces deux systèmes (Kim et al., 2010; LaSarre et Federle, 2013; Lee et Zhang, 2014; Maura et al., 2016; Moradali et al., 2017; Wagner et al., 2003). **B.** Régulations par la voie Chp/Vfr. Lors d'une tension mécanique (contact avec une surface par exemple), les pili de type IV se rétractent et transduisent un signal menant à la production d'AMPc et à l'activité de Vfr. Ce régulateur intervient dans la régulation du système de sécrétion de type III via ExsA, ainsi que dans la régulation du quorum sensing, et à la production des facteurs de virulence (Beaussart et al., 2014; Brutinel et al., 2009; Fuchs et al., 2010; Fulcher et al., 2010; Inclan et al., 2016; Lee et Zhang, 2014; Persat et al., 2015; West et al., 1994).

critique dans sa liste de pathogènes contre lesquels la recherche et le développement de nouvelles thérapies doivent être accélérés (WHO, 2017).

Les infections liées à *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être de deux types, des infections aigües, correspondant à un mode de vie planctonique et associées à la production de facteurs de virulence, ou des infections chroniques, caractéristiques d'un mode de vie sessile (biofilm) et associées à la production de matrice, principalement composée d'exopolysaccharides (EPS). Une régulation fine de ses gènes, dictée par les conditions environnementales dans lesquelles se situe la bactérie, permet la transition entre ces deux modes de vie (Coggan et Wolfgang, 2012).

2. Bases moléculaires de la virulence

a. Infections aigües

i. Facteurs de virulence

De nombreux facteurs de virulence existent chez *P. aeruginosa*, tels que les élastases, les rhamnolipides ou encore la pyocyanine (Figure 1). Ces facteurs de virulence sont principalement sécrétés par six systèmes de sécrétion présents chez cette bactérie (Filloux, 2011).

L'élastase est une protéase, capable de dégrader l'élastine, un composant de tissus eucaryotes. *P. aeruginosa* en possède deux, les élastases A et B (codées par les gènes *lasA* et *lasB*,

respectivement) qui agissent en synergie : l'élastase A coupant l'élastine et favorisant son accessibilité à l'élastase B, qui termine la protéolyse de l'élastine (**Galloway, 1991**). Cela favorise par exemple l'invasion de tissus eucaryotes par les bactéries due à l'augmentation de la perméabilité des muqueuses par la rupture des épithéliums pulmonaires (**Nomura et al., 2014**). Ces facteurs de virulence sont également impliqués dans l'inactivation des immunoglobulines A (**Heck et al., 1990**) et immunoglobulines G (**Bainbridge et Fick, 1989**) ou encore des composants du complément (**Schultz et Miller, 1974**).

Les rhamnolipides sont des glycolipides et biosurfactants possédant un pouvoir détergent. Deux classes de rhamnolipides sont synthétisées par *P. aeruginosa*, les mono et les di-rhamnolipides. Ils sont synthétisés par les enzymes RhlA, RhlB (mono-rhamnolipide), et RhlC (di-rhamnolipide) (**Zhu et Rock, 2008**). En plus de leur pouvoir détergent sur les cellules de l'épithélium pulmonaire, les rhamnolipides sont très importants dans la constitution et la dispersion du biofilm (**Davey et al., 2003**) et dans la mobilité de type swarming, qui est également dépendante du QS (**Köhler et al., 2000**).

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie, lui conférant son nom de « bacille pyocyanique » due à la couleur typique et caractéristique des cultures et infections liées à *P. aeruginosa*. Outre la couleur, c'est un des plus importants facteurs de virulence de cette bactérie, de par son implication dans de multiples mécanismes de virulence. Cette molécule inactive la catalase des cellules eucaryotes, augmentant le taux de radicaux libres et le stress oxydatif, ce qui conduit à la nécrose tissulaire (**O'Malley et al., 2003**). Elle peut également inhiber la respiration cellulaire ou la fonction ciliaire des cellules pulmonaires (**Sorensen et Joseph, 1993**).

Les lectines PA-IL et PA-IIL sont des facteurs de virulence synthétisés par LecA et LecB, respectivement. Ce sont des adhésines (**Chemani et al., 2009**) montrant de fortes affinités pour le galactose et le fucose, respectivement, sucres que l'on peut retrouver à la surface des cellules procaryotes et eucaryotes (**Gilboa-Garber, 1988**). La lectine PA-IL joue un rôle dans la perméabilisation membranaire des cellules eucaryotes (**Laughlin et al., 2000**) et est toxique pour les cellules respiratoires (**Bajolet-Laudinat et al., 1994**). La lectine PA-IIL inhibe le battement ciliaire des cellules pulmonaires (**Adam et al., 1997**). Enfin, les deux lectines jouent un rôle important dans l'adhésion (**Chemani et al., 2009**) et la structuration du biofilm, en liant les bactéries entre elles et avec les EPS de la matrice (**Diggle et al., 2006; Passos da Silva et al., 2019**).

L'exotoxine A est une toxine sécrétée par la bactérie, ciblant la synthèse protéique de la cellule cible et entraînant la mort de la cellule cible par nécrose (Wick et al., 1990). Trois phospholipases C ont été identifiées chez *P. aeruginosa*, possédant des spécificités de substrat différentes. Elles agissent sur la cellule cible en dégradant les phospholipides de ses membranes (Stonehouse et al., 2002). Le cyanure d'hydrogène quant à lui, n'est produit qu'en condition de microaérophilie, à 37°C, des conditions qui sont retrouvées au sein de poumons de patients. Ce gaz très toxique va inhiber la respiration aérobie des cellules cibles par liaison irréversible avec l'oxydase terminale de la chaîne respiratoire (Lenney et Gilchrist, 2011). La protéase alcaline est une protéase hydrolysant la fibrine, facilitant ainsi l'infection (Khalifa et al., 2011).

Il est à noter que *P. aeruginosa* possède de nombreux systèmes d'acquisition du fer, via notamment la production de sidérophores, comme la pyoverdine. Ils sont notamment régulés par de nombreux facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (Facteurs σ ECF) qui seront décrits ultérieurement (Chevalier et al., 2018), les petits ARNs PrrF1 et PrrF2 et le répresseur majeur Fur. Ce répresseur, en absence de fer, ne se fixe pas sur ses séquences régulatrices, et permet la transcription et la production de nombreux systèmes d'acquisition du fer, et donc de sidérophores, dont certains sont des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*, comme la pyoverdine et la pyochéline (Visca et al., 2002 ; Visca et Imperi, 2018).

Enfin, le système de sécrétion de type III permettant, après un contact entre la bactérie et la cellule eucaryote cible, de délivrer directement dans cette cellule ses effecteurs, que sont les exoenzymes ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Les exoenzymes ExoS et ExoT possèdent chacune une activité inhibant les GTPases de la cellule cible, ainsi qu'une activité ADP-ribosylation. L'exoenzyme ExoY est une adénylate cyclase permettant l'élévation du taux d'AMPc dans la cellule cible et l'exoenzyme ExoU est une phospholipase. L'ensemble de ces toxines conduit à la réorganisation du cytosquelette et à la nécrose de la cellule cible (Barbieri et Sun, 2004).

ii. Régulation de la production des facteurs de virulence

❖ Quorum Sensing

La capacité de *P. aeruginosa* à provoquer ces infections aiguës repose sur la production des facteurs de virulence précédemment décrits, qui sont sous la dépendance de systèmes de communication intercellulaire, appelé « quorum sensing » (QS). Ces systèmes sont régulés par la densité de la communauté bactérienne, permettant ainsi la synchronisation du métabolisme et de la physiologie des cellules en réponse à un environnement donné. La communication entre bactéries est assurée par de petites molécules nommées autoinducteurs, que les bactéries produisent et sécrètent de façon continue en très faible quantité. Lorsque la densité cellulaire,

et donc la concentration de ces autoinducteurs atteint un seuil critique (le quorum), une cascade de régulation se déclenche, permettant *in fine* la régulation d'un grand nombre de gènes de façon coordonnée, ainsi qu'une très forte augmentation de la production d'autoinducteurs. Il est également à noter que la plupart de ces systèmes s'auto-induisent une fois le quorum atteint, permettant une boucle de rétroaction positive (**LaSarre et Federle, 2013**).

Chez *P. aeruginosa*, environ 10 % des gènes, et en particulier de nombreux gènes de virulence, sont régulés par ce mécanisme de communication. Cette bactérie possède trois systèmes de QS, hiérarchisés et étroitement interconnectés : les systèmes Las, Rhl et PQS (**Moradali et al., 2017**).

La **figure 1A** présente ces différents systèmes de communication et leurs interconnexions. Le système Las utilise un autoinducteur de type N-acyl-homosérine lactone (HSL), la N-(3-oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL). Ce système, activé en tout début de phase stationnaire dans une culture planctonique (**Wagner et al., 2003**), est composé de l'enzyme synthétisant la 3-oxo-C₁₂-HSL, LasI, et du récepteur, LasR, qui va également jouer le rôle de régulateur de réponse lors de sa liaison avec la 3-oxo-C₁₂-HSL. Il est situé au sommet de la hiérarchie des systèmes de QS chez *P. aeruginosa*, et va de fait contrôler la régulation de son propre système, ainsi que des systèmes Rhl et PQS (**Lee et Zhang, 2014**).

Le système Rhl utilise également un autoinducteur de type HSL, la N-butyryl-L-homosérine lactone (C₄-HSL), avec RhlI en tant qu'enzyme, et RhlR en tant que récepteur et régulateur de réponse. Ce système, activé immédiatement après le système Las dans une culture planctonique (**Wagner et al., 2003**), est capable de s'autoréguler et d'inhiber la transcription de PqsR, le régulateur du système PQS (**Figure 1A ; Lee et Zhang, 2014**).

Le troisième système de communication diffère des deux autres, et est basé sur l'utilisation d'une quinolone comme molécule de communication, la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, aussi nommée Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). La synthèse de cette molécule est plus complexe. PqsA, B, C et D sont des enzymes catalysant la conversion de l'anthranilate en 2-heptyl-4-quinolone (HHQ). HHQ est ensuite hydroxylé par PqsH, permettant de produire PQS. Cette molécule se fixe sur PqsR pour activer la transcription des gènes sous sa dépendance (**Lee et Zhang, 2014**). Il est à noter que HHQ joue également un rôle de signal (**Kim et al., 2010**). Ce système est le plus souvent présenté comme un modulateur des deux autres systèmes de QS, car, en plus de s'autoréguler et de réguler l'opéron *pqsABCDE*, PqsR est ainsi impliqué dans la régulation de *lasR* et *rhlR* (**Figure 1A ; Lee et Zhang, 2014; Maura et al., 2016**).

Tableau 1. Liste des régulateurs du quorum sensing (adapté de Lee et Zhang, 2014).

Régulateur	Mécanisme d'action
AlgR2	Régulateur transcriptionnel négatif de <i>lasR</i> et <i>rhlR</i>
DksA	Régulateur transcriptionnel négatif de <i>lasI</i>
GacA/GacS	Régulateur transcriptionnel positif de <i>lasR</i> et <i>rhlR</i>
MvaT	Régulateur transcriptionnel négatif global
QscR	Anti-activateur de LasR
QslA	Anti-activateur de LasR et PqsR
QteE	Régulateur post-traductionnel négatif de LasR et RhlR
RpoN	Régulateur transcriptionnel négatif de <i>lasRI</i> et <i>rhlRI</i>
RpoS	Régulateur transcriptionnel négatif de <i>rhlI</i>
RsaL	Régulateur transcriptionnel négatif de <i>lasI</i>
RsmA	Régulateur post-transcriptionnel négatif de <i>lasI</i>
Vfr	Régulateur transcriptionnel positif de <i>lasR</i> et <i>rhlR</i>
VqsR	Régulateur transcriptionnel positif de <i>lasI</i>

Enfin, un article très récent a montré que l'association de la bactérie à une surface soit nécessaire pour induire pleinement le régulon Las. Cette induction passerait par les pili de type IV et un petit ARN non-codant, LrsI augmentant l'expression de *lasR*. Cette association et la liaison de la 3-oxo-C₁₂ permettrait l'induction complète du régulon Las (Chuang et al., 2019). Cette notion reste à préciser et à développer afin de comprendre l'ensemble des mécanismes et le bénéfice de ce système pour la bactérie.

❖ Voie Chp/Vfr

En plus du QS, la voie Chp/Vfr est un autre système permettant l'induction de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*. Vfr a été décrit pour la première fois en 1994 (West et al., 1994). Ce régulateur fait partie d'une voie de régulation impliquant la synthèse d'un second messager intracellulaire, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (West et al., 1994).

La **figure 1B**. représente cette voie de régulation. Sa particularité est d'être déclenchée lors de la perception d'une surface par le pilus de type IV de la bactérie. Après adhésion du pilus de type IV au substrat, la tension induite provoque un changement de conformation de ce pilus via la piline majoritaire PilA (Beaussart et al., 2014; Inclan et al., 2016; Persat et al., 2015). Ce changement de conformation permet son interaction avec le complexe PilJ-ChpA, ce qui conduit à l'autophosphorylation de ChpA. Le groupement phosphate est ensuite transféré au régulateur de réponse PilG, qui va stimuler la production d'AMPC à partir d'adénosine triphosphate (ATP) via les deux adénylate cyclases CyaA et CyaB, majoritairement par cette dernière (Fulcher et al., 2010; Inclan et al., 2016). Cette augmentation du taux d'AMPC dans la cellule va permettre l'activation de Vfr par liaison directe, qui va réguler les gènes sous sa dépendance (Fuchs et al., 2010).

Parmi ces gènes, Vfr peut directement réguler le gène codant pour l'exotoxineA (*toxA*), ou encore *exsA*, codant le régulateur transcriptionnel majeur du système de sécrétion de type III (Brutinel et al., 2009). Il est de plus capable de réguler positivement l'expression de *lasR* et *rhlR*, permettant ainsi l'activation du QS et la production des facteurs de virulence associés (Albus et al., 1997; Lee et Zhang, 2014).

❖ Régulation du QS

Plusieurs régulateurs du QS existent chez *P. aeruginosa*, et sont référencés dans le **Tableau 1**. Ces régulateurs ajoutent un niveau de complexité supplémentaire quant à la régulation de la virulence de cette bactérie (Lee et Zhang, 2014). Il est à rajouter à ce tableau que les petits

ARNs PrrF1, PrrF2 et PhrS ont également été décrits comme des régulateurs du QS (**Rutherford et Bassler, 2012; Sonnleitner et al., 2011**).

Parmi ces régulateurs, RpoS est un facteur σ , régulant les gènes impliqués dans la réponse aux stress et la phase stationnaire de croissance (**Potvin et al., 2008**). Ce facteur σ possède un régulon d'environ 800 gènes, dont 40% sont des gènes qui sont également régulés par le QS, suggérant une régulation croisée de certains facteurs de virulence par RpoS et le QS. De plus, il a été montré que RpoS pouvait réguler le QS par inhibition de *rhII* (**Schuster et al., 2004**). RpoS peut également directement réguler plusieurs gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence, tels que les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A ou encore l'exoenzyme ExoS (**Potvin et al., 2008**). De plus, RhIR est capable d'activer la transcription de *rpoS* (**Latifi et al., 1996**), alors que Vfr est capable de l'inhiber (**Figure 1B ; Bertani et al., 2003**).

Un autre ensemble de régulation existe au travers de la capacité de la bactérie à ressentir et à répondre à certains signaux externes. Par exemple, certaines molécules produites par les cellules eucaryotes peuvent être détectées, comme l'interféron γ ou la dynorphine. En réponse, la bactérie peut activer certains gènes du QS, déclenchant la cascade de réponse décrite précédemment (**Lee et Zhang, 2014**).

b. Infections chroniques

Ce type d'infection est lié à un mode de vie sessile de la bactérie, qui va adopter une vie communautaire et former un biofilm, fixée ou pas sur une surface. Cette forme de vie permet également d'augmenter la résistance à différents stress comme les antibiotiques. C'est un des moyens de la bactérie de se protéger dans des environnements hostiles (**Taylor et al., 2014**). Il est à noter que *P. aeruginosa* peut également former des biofilms à l'interface air-liquide, nommés « pellicules », avec la particularité de ne pas être adhérents à une surface (**Friedman et Kolter, 2003**). Dans ce cas, le biofilm se présente sous forme d'agrégats de cellules, associés à une matrice exocellulaire. Le phénotype de ces cellules sous forme d'agrégats ressemble à celui des cellules attachées à une surface (**Alhede et al., 2011**).

i. Naissance et maturation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un processus cyclique. Elle débute par un contact entre la bactérie et une surface qu'elle soit biotique ou abiotique, ou entre deux cellules. La phase d'adhésion réversible implique généralement d'une part le flagelle de *P. aeruginosa*, qui va lui permettre de se déplacer dans un milieu (mobilité de type « swimming »), et d'autre part des interactions hydrophiles et hydrophobes entre la surface et la membrane de la bactérie. La phase d'adhésion

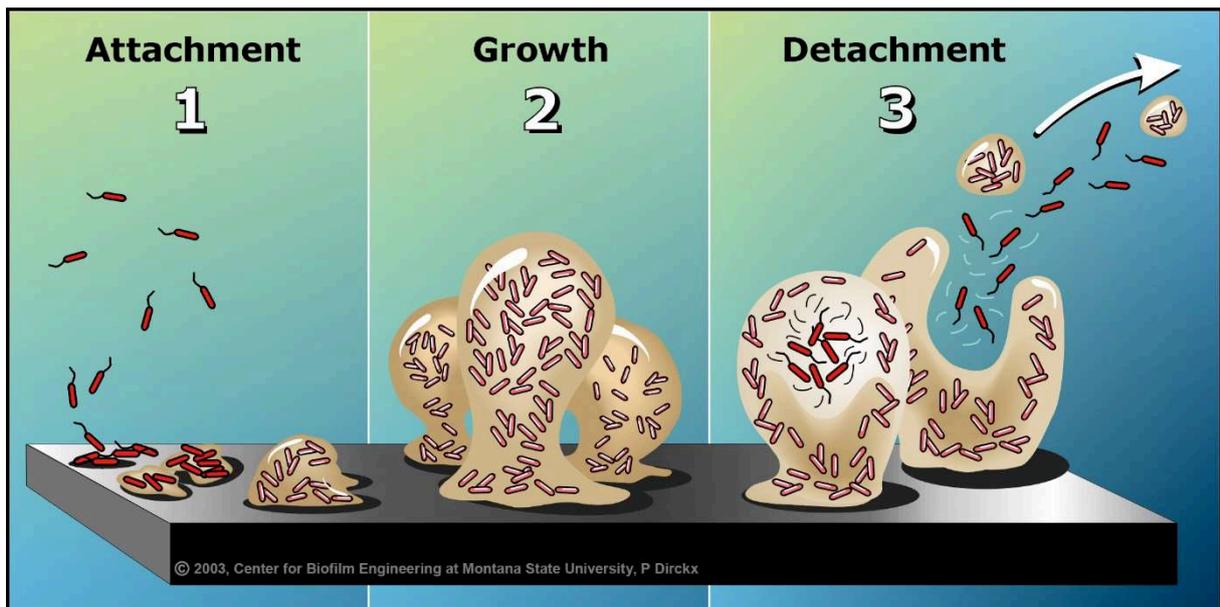


Figure 2. Modèle de formation de biofilms chez *P. aeruginosa*.

1. Les cellules planctoniques entrent en contact avec une surface et adhèrent de façon réversible, puis irréversible. De petits agrégats se forment, entourés de plus en plus de matrice. 2. La maturation du biofilm continue par la multiplication des cellules et la formation de plus en plus dense de matrice. Des microcolonies se forment, sorte de « champignons » très structurés. 3. Le métabolisme des bactéries, selon leur positionnement dans ces microcolonies varie, permettant la dispersion lorsque les microcolonies sont arrivées à maturité. La dispersion, en plus de disperser des cellules planctoniques, relâche également des agrégats de biofilm, permettant une colonisation accrue des surfaces (**Center for Biofilm Engineering, Montana University**).

irréversible à la surface fait intervenir des déterminants de *P. aeruginosa*, comme les flagelles, les pili de type IV et les fimbriae. De plus, *P. aeruginosa* enclenche le début de synthèse de Psl et ADN extracellulaire (ADNe) pour amplifier l'adhésion cellulaire à la surface (**Figure 2-1 ; Joo et Otto, 2012**).

Cette étape d'adhésion primaire terminée, l'adhésion et le recrutement d'autres bactéries vont être facilités grâce aux EPS synthétisés par les bactéries précédemment adhérees (**Stoodley et al., 2002**). Ces dernières vont, quant à elles, commencer à se diviser activement afin de coloniser la surface environnante. La mobilité de type « twitching » via les pili de type IV, va également permettre aux bactéries de coloniser la surface, mais surtout permettre le regroupement des bactéries pour former la base des micro-colonies (**Figure 2-1 ; Klausen et al., 2003**).

La maturation du biofilm va se poursuivre, avec d'une part une augmentation de la biomasse par division cellulaire, et d'autre part la formation de la matrice cellulaire et de la structure tridimensionnelle des micro-colonies. La matrice est essentiellement composée d'EPS, d'ADNe, de protéines, de vésicules et d'eau et est détaillée ci-après (**Wei et Ma, 2013**). C'est à cette étape que les structures tri-dimensionnelles en forme de « champignons » vont apparaître, bien qu'il faille noter que la structure du biofilm varie en fonction des conditions culturales (vitesse du flux extérieur, conditions physico-chimiques et biologiques, nutriments...), et ne présente donc pas forcément ces structures (**Bedi et al., 2018**). C'est à l'intérieur de ces structures que se joue la dernière étape de maturation, la dispersion (**Figure 2-2**). C'est également à la base de ces structures que l'on retrouve des cellules persistantes, les « persisters », des bactéries qui sont dans un état de dormance, insensibles aux antimicrobiens et métaboliquement inactives. Cet état très particulier est finalement le principal problème lors des infections liées aux biofilms. En effet, puisque métaboliquement inactives, aucun antibiotique ne peut les affecter, mais elles sont capables de sortir de cet état et de redevenir métaboliquement actives pour reformer un biofilm par la suite (**Lewis, 2010**).

La dispersion implique une sous-population présente spatialement en haut des micro-colonies s'auto-lysant pour permettre la libération d'une autre sous-population ayant retrouvé des caractéristiques planctoniques, et la colonisation d'autres surfaces (**Kim et Lee, 2016**). Pour cela, une réorganisation de la matrice du biofilm va s'opérer et conduire à la formation de cavités abritant cette sous-population de cellules planctoniques (**Figure 2-3 ; Ma et al., 2009**).

ii. Adhésion

❖ Flagelle

Le flagelle est une structure externe, nécessaire pour la mobilité de type « swimming ». Cette structure est donc nécessaire à la bactérie pour se déplacer en milieu liquide et ainsi avoir la possibilité de coloniser de nouvelles niches écologiques. Il est également impliqué dans la première étape d'adhésion sur des surfaces hydrophobes (**Bruzaud et al., 2015**).

❖ Pili de type IV

Ces structures externes sont requises pour la formation de biofilm chez cette bactérie. Ce sont des adhésines, bases de la mobilité de type « twitching », par mouvements d'extension/rétractation séquentiels et coordonnés des pili (**Talà et al., 2019**). Ils sont également impliqués dans la mobilité de type « swarming » (**Köhler et al., 2000**). Ces déterminants permettent l'adhésion irréversible des cellules de *P. aeruginosa* aux surfaces, et le début de formation des microcolonies par regroupement des cellules entre elles via la mobilité de type « twitching » (**Klausen et al., 2003**). Ces structures comprennent le pilus à proprement parler, composé de polymères de piline (protéine PilA), ainsi que des structures d'ancrage aux membranes, d'exports de protéines, des ATPases amenant l'énergie nécessaire à l'extension et rétractation du pilus, et des protéines annexes impliquées dans la signalisation et la régulation de fonctions cellulaires liées aux pili de type IV (**Ayers et al., 2010**).

iii. Matrice du biofilm

La matrice exocellulaire produite par *P. aeruginosa* au cours de la formation de biofilm est essentielle pour la stabilité et la protection des cellules bactériennes contre les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Il a notamment été décrit que les cellules en mode de vie biofilm toléraient la présence d'antibiotiques, soit parce que la matrice les séquestre, ou bien parce qu'ils n'atteignent pas les cellules à cause de la densité de cette matrice. La matrice du biofilm peut également offrir une protection contre la dessiccation. Il a également été montré que le transfert d'ADN augmentait au sein de biofilms, grâce à l'ADNe et la proximité des cellules entre elles, et que le taux de mutations augmentait également, à cause notamment d'une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), permettant une adaptation plus rapide des cellules (**Costerton et al., 1999; Maunders et Welch, 2017; Rybtke et al., 2015**).

❖ Exopolysaccharides

Trois types d'EPS ont été identifiés chez *P. aeruginosa* : les alginates, Pel et Psl. Si les alginates sont étudiés depuis longtemps, notamment de par leur implication dans la conversion mucoïde et leur impact dans la mucoviscidose, bon nombre de souches de laboratoire sont non-mucoïdes.

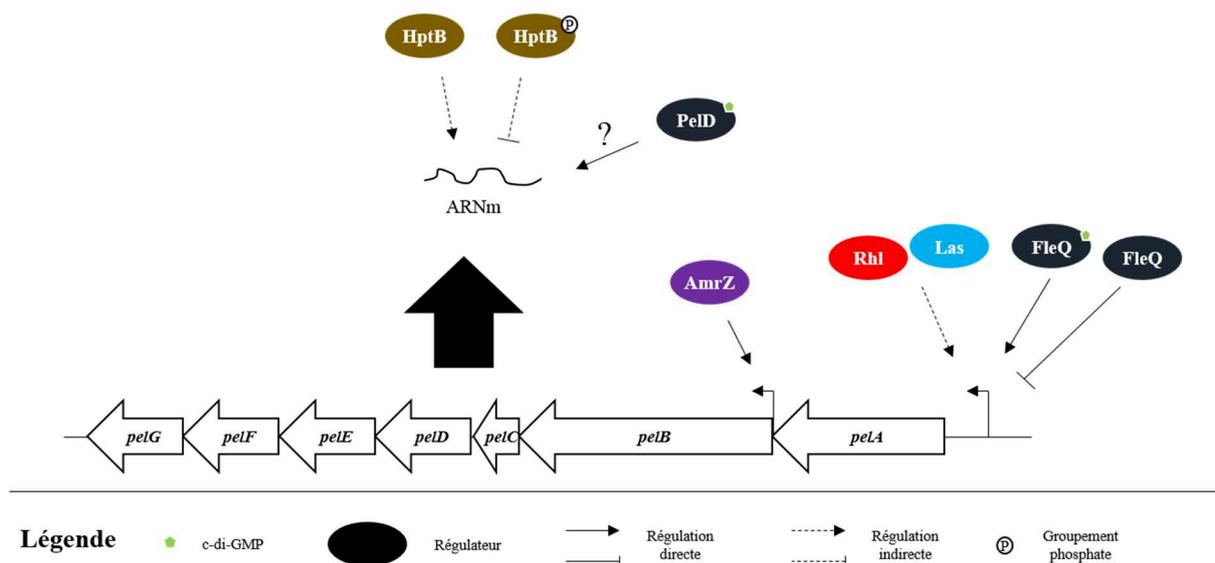


Figure 3. Régulation de la production de Pel.

L'opéron *pel* est composé de 7 gènes. Au niveau transcriptionnel, AmrZ (seulement sur *pelB*), FleQ et le quorum sensing sont impliqués dans la régulation de l'opéron *pel* de manière indirecte. L'effet de FleQ sur la transcription est dépendant de sa liaison ou non au c-di-GMP. Au niveau post-transcriptionnel, la voie HptB via RsmY et RsmA, ainsi que PelD, par un moyen restant à déterminer, sont impliqués dans sa régulation (Bordi et al., 2010; Franklin et al., 2011; Jones et al., 2014; Lee et al., 2007; Maunders et Welch, 2017; Sakuragi et Kolter, 2007; Valentini et al., 2016; Valentini et Filloux, 2016).

C'est seulement au début des années 2000 que Pel et Psl ont été décrits comme étant les EPS principaux de la matrice de biofilms des souches non-mucoïdes (uniquement Pel chez *P. aeruginosa* PA14) (Friedman et Kolter, 2003, 2004).

- *Pel*

Pel est un EPS cationique composé en majorité de N-acétylgalactosamine, ainsi que de N-acétylglucosamine, reliés par des liaisons β 1-4 (Jennings et al., 2015). Pel a été décrit comme essentiel pour la formation de pellicule en condition statique. Il pourrait lier l'ADNe permettant la consolidation de la matrice du biofilm (Friedman et Kolter, 2003), et aurait un rôle dans l'adhésion aux surfaces (Ghafoor et al., 2011). De plus, la formation de biofilm d'une souche déficiente en Pel est grandement impactée, mais seulement dans les étapes tardives de maturation (Ghafoor et al., 2011). Il est également à noter que Pel est un EPS essentiel chez *P. aeruginosa* PA14, étant donné que, chez cette souche, Psl n'est pas produit. Chez *P. aeruginosa* PAO1, le rôle de Pel semble moins important que Psl, étant donné que l'absence de synthèse de Pel n'affecte pas la formation de biofilm (Colvin et al., 2011).

Un opéron composé de 7 gènes (*pelA-pelG*) permet la biosynthèse de Pel (Franklin et al., 2011). La régulation de cet opéron est schématisée en **figure 3**. Au niveau transcriptionnel, cet opéron est régulé par FleQ et le QS. FleQ, s'il est lié ou non au c-di-GMP, va permettre l'induction ou l'inhibition de la transcription de l'opéron, respectivement (Maunder et Welch, 2017). Les systèmes Las et Rhl ont également été montrés comme étant impliqués dans la régulation de la transcription de cet opéron, par un moyen probablement indirect, comme suggéré par les auteurs (Sakuragi et Kolter, 2007). AmrZ, un régulateur transcriptionnel, est capable d'activer la transcription de *pelB* (Jones et al., 2014). Au niveau post-transcriptionnel, la voie HptB a été montrée comme modulateur de la synthèse de Pel. Lorsque HptB n'est pas activé, HsbD va permettre la transcription de RsmY et la séquestration de RsmA, qui ne peut réprimer les ARNm des gènes de l'opéron. A l'inverse, quand HptB est activé par phosphorylation, il peut activer RetS, qui inhibe GacS et GacA, et ne permet donc pas la transcription de RsmY et RsmZ. Cela a pour effet de laisser RsmA libre d'aller réprimer les ARNm de l'opéron Pel (**Figure 3 ; Figure 7B ; Bordi et al., 2010; Valentini et al., 2016**). Enfin, PelD est une protéine possédant un domaine de fixation au c-di-GMP, essentielle pour la synthèse de Pel, mais par un moyen d'action inconnu (Lee et al., 2007).

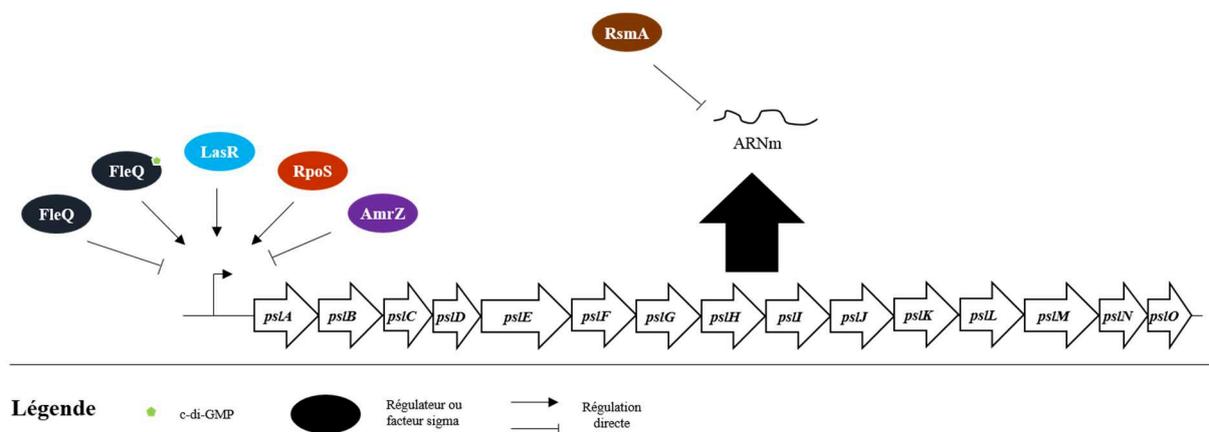


Figure 4. Régulation de la production de Psl.

Le cluster de gènes *psl* est composé de 15 gènes. Au niveau transcriptionnel, AmrZ, LasR, le facteur sigma RpoS et FleQ sont impliqués dans sa régulation. L'effet de FleQ sur la transcription est dépendant de sa liaison ou non au c-di-GMP. Au niveau post-transcriptionnel, seul RsmA semble impliqué (Byrd et al., 2009; Gilbert et al., 2009; Irie et al., 2010; Jones et al., 2014, 2013; Maunders et Welch, 2017).

- *Psl*

Psl est un EPS formé par la répétition de penta-saccharides de D-mannose, L-rhamnose et D-glucose (Byrd et al., 2009). Comme mentionné précédemment, il n'est pas synthétisé chez *P. aeruginosa* PA14, à cause d'une délétion de trois gènes, à partir du promoteur de l'opéron, jusqu'à *pslC* (Colvin et al., 2011). Chez *P. aeruginosa* PAO1, cet EPS est crucial car c'est un composant qui promeut l'attachement aux surfaces et les interactions cellules-cellules. Il contribue de fait à la formation des microcolonies par recrutement d'autres cellules. Lors des étapes plus tardives, il intervient dans le maintien de l'architecture, et le remaniement du biofilm lors de l'apparition des cavités à l'intérieur des microcolonies (Jackson et al., 2004; Ma et al., 2009; Zhao et al., 2013). Enfin, il est impliqué dans la communication intercellulaire, puisqu'il a été montré que Psl peut jouer le rôle de signal et stimuler SiaD et SadC. La stimulation de ces deux diguanylate cyclases permet l'augmentation de la concentration en c-di-GMP à l'intérieur de la cellule et l'orienter vers un phénotype biofilm, permettant une boucle de rétroaction positive (Irie et al., 2012).

Un ensemble de 15 gènes (*pslA-pslO*) permet la synthèse de Psl (Byrd et al., 2009). La régulation de ce cluster de gènes est schématisée en **figure 4**. Au niveau transcriptionnel, l'opéron *psl* est régulé par FleQ, de la même façon que pour l'opéron *pel* (Maunder et Welch, 2017). LasR peut également directement activer la transcription des gènes *psl*, démontrant un lien, cette fois-ci direct, entre le QS et la formation de biofilm via la production d'EPS (Gilbert et al., 2009). AmrZ a été démontré comme pouvant directement réprimer le cluster *psl* (Jones et al., 2013). Etant donné que ce régulateur peut activer la transcription des gènes impliqués dans la production des alginates et de *pelB*, il a été suggéré qu'il pouvait être impliqué dans la transition du type d'EPS produits, de Psl à Pel et alginates (Jones et al., 2014). RpoS a également été montré comme pouvant activer la transcription de ce cluster. Au niveau post-transcriptionnel, RsmA, quand il est sous forme libre, peut exercer son rôle de répresseur sur ses ARNm cibles (**Figure 4 ; Figure 7B ; Irie et al., 2010**).

- *Alginates*

Les alginates sont synthétisés *de novo* en une longue chaîne d'acide D-mannuronique. Ils pourront ensuite être, dans le périplasma, soit O-acétylés, soit épimérisés en acide L-guluronique, de façon aléatoire à l'échelle du polymère. Un polymère d'alginate ne ressemblera donc pas à un autre (Franklin et al., 2011). Les alginates sont des EPS synthétisés en grande quantité par des souches dites « mucoïdes », isolées à partir de patients souffrant de mucoviscidose. Ils ne sont pas nécessaires à la formation de biofilm dans le cas de souches non-

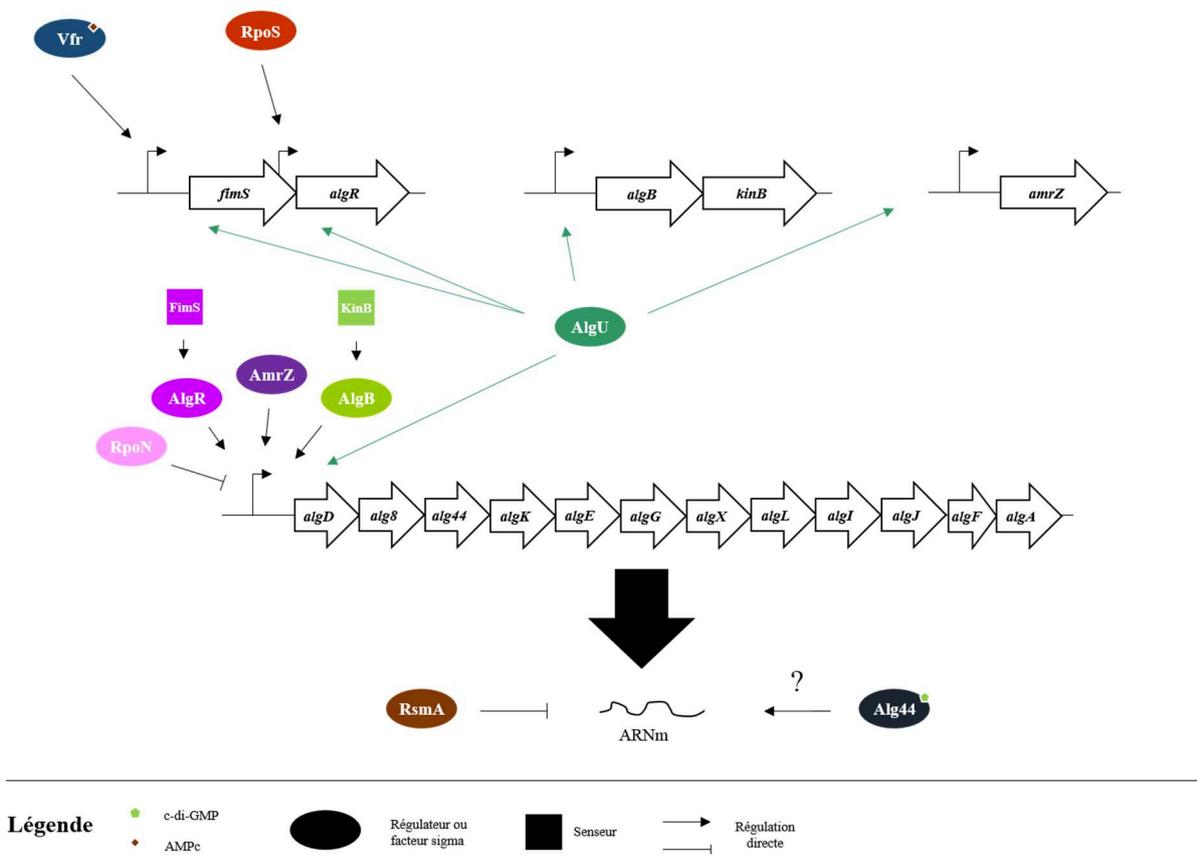


Figure 5. Régulation de la synthèse des alginate.

Un opéron de 12 gènes permet la biosynthèse des alginate. Deux autres opérons de deux gènes, ainsi qu'un gène orphelin, sont impliqués dans la régulation de la production des alginate. Le régulateur principal de cet opéron est le facteur sigma ECF AlgU, qui est au sommet de la chaîne de régulation. AlgU peut réguler l'opéron de production des alginate, les deux opérons de deux gènes codants pour des systèmes à deux composants, ainsi qu'*amrZ*. Les gènes codant pour le système à deux composants FimS-AlgR sont également régulés par Vfr et RpoS, respectivement. L'opéron alginate est également régulé par AlgR, AlgB, AmrZ, et le facteur sigma RpoN. Au niveau post-transcriptionnel, RsmA est impliqué, ainsi qu'Alg44 lié au c-di-GMP, par un moyen inconnu (Hay et al., 2014; Pritchett et al., 2015).

mucoïdes, puisque ce sont Psl et Pel qui seront préférentiellement utilisés (Wozniak et al., 2003). Dans environ 80% des cas, la surexpression des alginates observée chez les souches mucoïdes est due à une adaptation à l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose (Pritt et al., 2007; Williams et al., 2010). Les alginates offrirait une protection à la bactérie contre la déshydratation, l'opsonisation ou encore la phagocytose, et lui permettrait de former des biofilms résistants (Pritt et al., 2007).

Les alginates sont formés à partir d'un opéron de 12 gènes. La régulation de cet opéron est schématisée en **figure 5**. Le régulateur principal de la production des alginates est le facteur σ ECF AlgU. Il sera présenté plus en détail ultérieurement dans ce manuscrit, comme les mécanismes basiques de la conversion mucoïde. Brièvement, il peut activer la transcription de l'opéron entier *algD-algA* permettant la synthèse des alginates, de *fimS-algR*, *algB-kinB* et *amrZ*. FimS-AlgR et KinB-AlgB sont des systèmes à deux composants (TCS), dont les régulateurs de réponse non-phosphorylés sont des activateurs de l'opéron *algD-algA*, tout comme AmrZ. RpoN, un facteur σ de réponse aux carences en azote, peut, quant à lui, réprimer l'opéron *algD-algA* (Hay et al., 2014). Enfin, Vfr et RpoS peuvent activer la transcription des gènes *fimS* et *algR*, respectivement, permettant ainsi la régulation indirecte de la production d'alginates (Pritchett et al., 2015). Au niveau post-transcriptionnel, RsmA peut inhiber la traduction des ARNm des gènes de l'opéron *algD-algA* (**Figure 5 ; Figure 7B**). Le c-di-GMP joue lui aussi un rôle, lorsqu'il est lié à Alg44, puisque il a été montré qu'une abolition de la production d'alginates avait lieu lorsque le domaine de liaison au c-di-GMP d'Alg44 était délété (Hay et al., 2014). Cependant, le mécanisme d'activation de la production d'alginates par cette protéine reste à déterminer.

❖ ADN extracellulaire

L'ADNe est un autre composant majeur de la matrice du biofilm. Il provient de la lyse cellulaire d'une partie de la population ou des vésicules membranaires (Turnbull et al., 2016; Wei et Ma, 2013). Cette lyse peut être contrôlée par le TCS BfmS-BfmR, qui détecte l'ADNe et régule en réponse des gènes impliqués dans ces mécanismes (Petrova et al., 2011). Il permet d'augmenter également la fréquence des transferts de gènes horizontaux (Okshevsky et Meyer, 2015). Cet ADNe est capable de se lier aux EPS pour renforcer la matrice du biofilm (Jennings et al., 2015; Wang et al., 2015). De plus sa nature anionique lui permet de séquestrer des peptides cationiques ou des antibiotiques, comme la tobramycine (Lewenza, 2013; Okshevsky et Meyer, 2015; Tahrioui et al., 2019; Wilton et al., 2016).

❖ Protéines

Quelques études ont montré la présence de protéines dans la matrice du biofilm. Parmi les plus décrites, CdrA et les lectines LecA (PA-II) et LecB (PA-III) sont des adhésines renforçant la cohésion du biofilm. CdrA est une protéine sécrétée par son transporteur CdrB, capable d'interagir avec elle-même, mais également avec Psl, promouvant l'auto-agrégation cellulaire. Cette adhésine permet également la stabilisation et la bonne localisation de Psl dans la matrice du biofilm, tout en la protégeant de la protéolyse. De plus, le taux d'expression du gène *cdrA* est directement corrélé au taux de c-di-GMP, faisant de ce gène un excellent rapporteur du taux de c-di-GMP intracellulaire (**Borlee et al., 2010; Reichhardt et al., 2018**). Les lectines, décrites précédemment dans ce manuscrit pour leur rôle dans la virulence aigüe et l'adhésion aux surfaces biotiques, ont également un rôle important de structuration et de stabilisation de la matrice extracellulaire, par liaison avec les EPS (**Diggle et al., 2006; Passos da Silva et al., 2019**). Une étude protéomique comparant le protéome matriciel et le protéome des cellules sessiles a démontré l'existence de 108 protéines, dont 45 retrouvées exclusivement dans la matrice. Parmi elles, CdrA et CdrB, mais également les élastases LasA et LasB, des protéases et des protéines impliquées dans la capture du fer. De plus, des protéines de membrane externe ont été retrouvées, et montrées comme étant associées aux vésicules, révélant ainsi que ces vésicules étaient des composants majeurs de la matrice du biofilm (**Toyofuku et al., 2012**).

❖ Vésicules

Les vésicules sont des dérivés de membrane externe, ayant un diamètre d'environ 100 nm, pouvant véhiculer divers composés, tels que des protéines, des molécules de communication ou encore des acides nucléiques. En plus de véhiculer des protéines de membrane externe biologiquement actives, les vésicules transportent des protéases. Il a été suggéré que ces protéases pourraient avoir un rôle dans la compétition contre d'autres espèces bactériennes, favorisant l'installation de *P. aeruginosa* par libération de nutriments issus de la lyse d'autres espèces bactériennes (**Beveridge et al., 1997**). Une étude a également permis la mise en lumière des différences de composition protéique entre les vésicules issues de cellules planctoniques et celles issues de cellules sessiles. En effet, il semble que les vésicules issues de cellules planctoniques contiennent plus de facteurs de virulence que celles issues des cellules sessiles. A l'inverse, les vésicules issues de cellules sessiles contiendraient des transporteurs de fer, non retrouvés dans les vésicules issues des cellules planctoniques (**Toyofuku et al., 2012**). En biofilm, les mécanismes de biogénèse des vésicules sont encore mal connus. Néanmoins, il a été montré que les PQS étaient importants pour la biogénèse de ces vésicules

Biofilm dispersion is related with spatial differentiation of the following:

- motility
- degradation or production of EPS
- cell death and lysis
- production of rhamnolipids

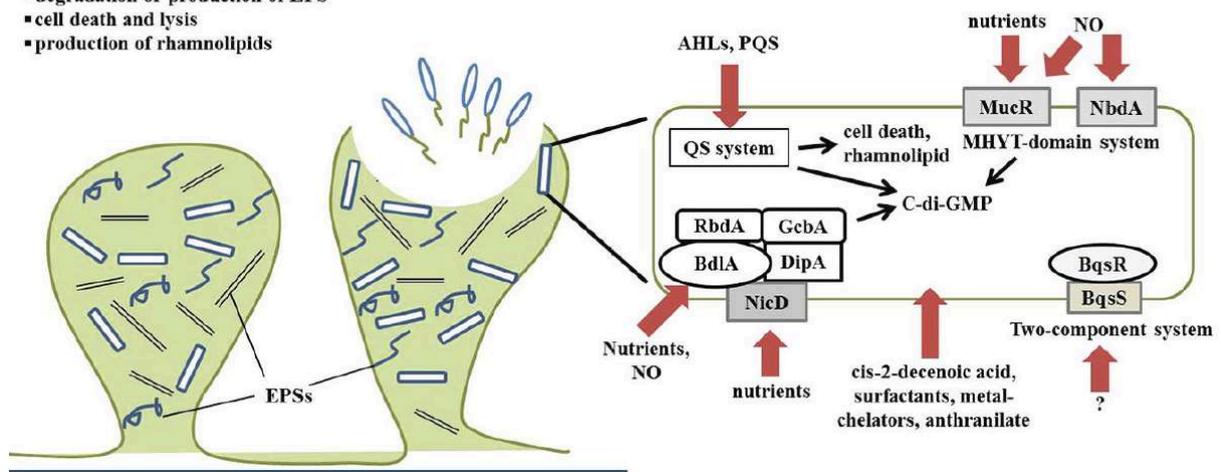


Figure 6. Facteurs liés à la dispersion du biofilm.

La dispersion du biofilm est liée majoritairement à la variation du taux de c-di-GMP intracellulaire, via différentes phosphodiesterases dont l'activité est liée à un changement des conditions environnementales (nutriments, présence d'oxyde d'azote, de rhamnolipides ou de molécules du quorum sensing). Une réorganisation des microcolonies est indispensable pour permettre la dispersion, telle qu'une dégradation de l'ADNe, des EPS, la lyse cellulaire d'une partie de la population, la synthèse de rhamnolipides et/ou une différenciation des cellules sessiles localisées au centre des microcolonies en cellules planctoniques (extraite de **Kim et Lee, 2016**).

(Cooke et al., 2019). De plus, il a été montré que la lyse cellulaire de cellules en mode de vie biofilm provoquait la formation de vésicules à partir des morceaux de membranes de la cellule lysée. Cette lyse cellulaire a été reliée à l'expression d'un gène présent dans un cluster codant une pyocine de type F et R, gène décrit comme codant une endolysine (Turnbull et al., 2016). Outre ces fonctions, les vésicules pourraient également servir de liens physiques entre les EPS, l'ADNe et les protéines présentes dans la matrice du biofilm, et participeraient donc à sa structuration (Kulkarni et Jagannadham, 2014).

iv. Dispersion des cellules

La dernière grande étape du biofilm, la dispersion, fait intervenir différents mécanismes, représentés sur la **figure 6** (Kim et Lee, 2016). Plusieurs signaux environnementaux peuvent déclencher la dispersion, comme la concentration en nutriments, la présence de surfactants ou de molécules du QS, ou encore la présence de NO. Une réorganisation de la structure est nécessaire pour permettre la dispersion. La dégradation d'ADNe et des EPS au centre et à la surface des microcolonies, une production de rhamnolipides, ainsi qu'une lyse cellulaire programmée, via l'induction du prophage Pf4 ou via les PQS, sont autant de réorganisations nécessaires au bon déroulement de cette étape. De plus, une différenciation des cellules est indispensable. Une partie des cellules présentes au centre des microcolonies redeviennent planctoniques par la synthèse de flagelles, notamment via la diminution du taux de c-di-GMP. Différentes protéines sont impliquées dans le métabolisme du c-di-GMP, comme RbdA, GcbdA, BdlA, DipA, NicD, MucR et NbdA, et vont influencer le taux de c-di-GMP (généralement en l'abaissant, grâce à leur domaine phosphodiesterase), les PQS qui vont agir comme un signal de lyse cellulaire, ou encore la production de rhamnolipides. Enfin, le TCS BqsS-BqsR a été montré comme étant impliqué dans la dispersion, mais le signal permettant son activation et son moyen d'action cellulaire n'a pas été décrit (Kim et Lee, 2016; McDougald et al., 2012).

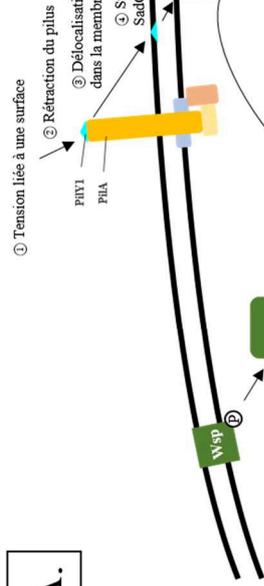
c. Transition entre mode de vie planctonique et mode de vie sessile

La transition entre les deux modes de vie de *P. aeruginosa* nécessite une fine régulation de ses gènes. Deux voies de régulation majeures contrôlent la transition planctonique/biofilm, la voie du diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), et la voie Gac/RsmA.

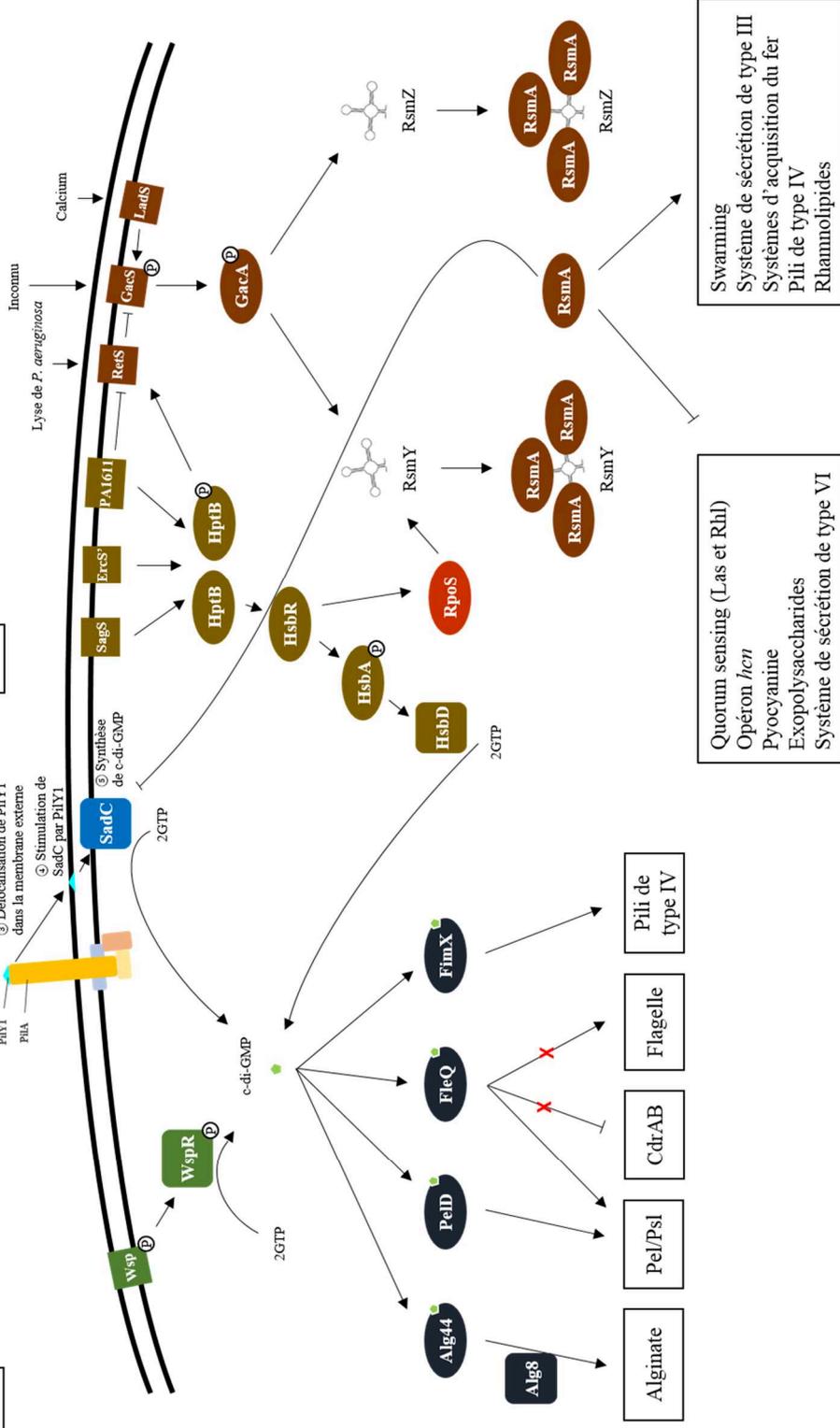
i. Voie du c-di-GMP

Le c-di-GMP est un second messager intracellulaire extrêmement important chez cette bactérie. En effet, le taux de cette molécule signal régule directement le mode de vie de la bactérie

A.



B.



BIOFILM

PLANCTONIQUE



Figure 7. Bases moléculaires de la transition entre les modes de vie planctonique et sessile.

A. Régulation de la transition entre les modes de vie par le c-di-GMP. Seuls les systèmes Wsp et SadC, qui conduisent à la production de c-di-GMP, sont représentés. Cette molécule va se fixer sur des régulateurs de réponse qui vont conduire à l'activation de différentes fonctions cellulaires impliquées dans la formation de biofilm, et à la répression d'autres fonctions impliquées dans le mode de vie planctonique de la cellule (**Francis et al., 2017; Inclan et al., 2016; Luo et al., 2015; Matsuyama et al., 2016; Maunders and Welch, 2017; Persat et al., 2015**). **B.** Régulation de la transition par la voie Gac/RsmA. Ce système à deux composants permet l'activation de GacA par phosphorylation, qui va lui-même favoriser la transcription de RsmY et RsmZ, deux ARNnc qui vont séquestrer RsmA, un répresseur traductionnel. Si libre, il réprime certaines fonctions cellulaires impliquées dans la formation de biofilm, et active indirectement d'autres fonctions cellulaires impliquées dans le mode de vie planctonique (**Brencic and Lory, 2009; Burrowes et al., 2006**). La voie HptB permet la modulation de cette voie et l'interconnexion entre le c-di-GMP et la voie Gac/RsmA (**Bhagirath et al., 2017; Bouillet et al., 2019; Broder et al., 2017; LeRoux et al., 2015; Lin et al., 2006; Mern et al., 2010; Moscoso et al., 2014; Petrova and Sauer, 2011; Valentini et al., 2016**).

(**Valentini et Filloux, 2016**), et est inversement corrélé avec celui de l'AMPc. Un mode de vie biofilm sera caractérisé par un haut taux de c-di-GMP et un bas taux d'AMPc, et inversement pour un mode de vie planctonique. En revanche, les mécanismes moléculaires sous-jacents d'une régulation directe entre ces deux molécules restent encore à définir (**Almblad et al., 2015**).

Le c-di-GMP est synthétisé à partir de deux guanosine triphosphates (GTP), par des diguanylate cyclases, et dégradé par des phosphodiesterases. Certaines enzymes possèdent les deux activités. Chez *P. aeruginosa* PAO1, il existe 17 diguanylate cyclases, 5 phosphodiesterases, et 16 enzymes possédant les deux activités (**Kulasekara et al., 2005**). Il est intéressant de noter que la plupart de ces enzymes contiennent des domaines protéiques senseurs variés, ou appartiennent à des systèmes protéiques liant des protéines senseurs et ces enzymes synthétisant ou dégradant le c-di-GMP, suggérant que les conditions environnementales affectent le taux de c-di-GMP au sein de la cellule (**Ha et O'Toole, 2015**).

Plusieurs systèmes peuvent ressentir le contact à une surface et stimuler la production de c-di-GMP. Un de ces systèmes est Wsp. Lorsque ce système multiprotéique est activé, il promeut la phosphorylation de WspR, une diguanylate cyclase (**Figure 7A ; Francis et al., 2017**). Un autre exemple de ces systèmes est SadC (**Figure 7A**). Lors d'un contact avec une surface, le pilus de type IV peut transduire ce signal mécanique en signal chimique via la production d'AMPc. En

parallèle, lors de la rétractation du pilus, PilY1 normalement présente au sommet du pilus se retrouve dans la membrane externe, et va ensuite stimuler la production de c-di-GMP via SadC (**Luo et al., 2015**). Ce mécanisme décrit récemment présente ainsi un continuum entre les deux modes de vie. Après que le pilus de type IV se soit rétracté sous l'influence d'une force mécanique, la production d'AMPC est déclenchée dans un premier temps, ce qui conduit à l'activation de Vfr et la production des facteurs de virulence. En parallèle, l'activation de SadC dans un deuxième temps conduit à la production de c-di-GMP, permettant de basculer d'un état planctonique à un état sessile, générant ainsi une continuité dans l'infection (**Inclan et al., 2016; Luo et al., 2015; Persat et al., 2015**).

La production de c-di-GMP conduit cette molécule à se fixer sur ses régulateurs de réponse (**Figure 7A**). Ainsi, la fixation du c-di-GMP sur Alg44 conduit à la production d'alginate via l'activation d'Alg8. Le même type de mécanisme est décrit concernant la production de Pel, via la liaison du c-di-GMP sur PelD. Cependant, le mécanisme d'action de PelD sur la production de Pel reste à déterminer. La liaison du c-di-GMP sur FimX permet également la régulation positive des pili de type IV. Enfin, le c-di-GMP peut se fixer sur FleQ, un régulateur ayant des effets pléiotropes au sein de la cellule. Selon la liaison ou non du c-di-GMP, cette protéine va différenciellement réguler ses cibles, grâce à un changement de conformation de la protéine. FleQ est un activateur majeur du flagelle qui va perdre cette fonction lors de sa liaison au c-di-GMP. C'est également un répresseur de l'opéron *cdrAB* en absence de c-di-GMP, répression qui sera levée par sa fixation à FleQ. Enfin, FleQ active ou inhibe les opérons *pel* et *psl* en présence ou absence, respectivement, de c-di-GMP. L'ensemble de ces changements conduit à l'établissement d'un biofilm et d'un mode de vie sessile (**Matsuyama et al., 2016; Maunders et Welch, 2017**).

ii. *Voie Gac/RsmA*

Cette voie fait intervenir d'une part le TCS GacS/GacA, et d'autre part le régulateur traductionnel RsmA (**Figure 7B**). GacS est un senseur qui va s'autophosphoryler en réponse à un signal qui reste inconnu. Le groupement phosphate est ensuite transmis à GacA, qui va activer la transcription de *rsmY* et *rsmZ*, deux petits ARN non codants (ARNnc). Ces ARNnc vont séquestrer RsmA, un répresseur capable de se lier aux ARN messagers (ARNm), afin d'inhiber leur traduction. Ce répresseur, sous forme libre, peut aller réguler directement des fonctions impliquées dans la formation de biofilm, comme la synthèse des EPS ou encore le système de sécrétion de type VI. Il est également capable d'activer des fonctions impliquées dans la virulence aigüe comme le système de sécrétion de type III, les systèmes d'acquisition

du fer, ou encore les mobilités de type « swarming » via les rhamnolipides et les pili de type IV (Brencic et Lory, 2009; Burrowes et al., 2006). Le mécanisme sous-jacent à cette activation reste peu clair, RsmA étant un répresseur post-transcriptionnel. Il est possible que ce répresseur se fixe sur les ARNm de répresseurs des fonctions impliquées dans la virulence aigüe ou il est également possible que cette protéine puisse stabiliser certains ARNm. En effet, RsmA est l'homologue de CsrA chez *E. coli*, et ce dernier a été montré comme pouvant jouer le rôle d'activateur par stabilisation de certains ARNm (Wei et al., 2001). La séquestration ou non de cette protéine permet donc d'orienter le mode de vie de la bactérie vers le biofilm ou la forme « libre » (Brencic et Lory, 2009; Burrowes et al., 2006).

iii. Modulation et interconnexion des deux voies

Il existe des régulateurs de la voie Gac/RsmA (Figure 7B). En effet, LadS active GacS en réponse à la présence de calcium (Broder et al., 2017), et RetS inhibe GacS en réponse à la présence de débris cellulaires issus de bactéries de la même espèce (LeRoux et al., 2015). La voie HptB, quant à elle, permet la régulation de la voie Gac/RsmA à plusieurs niveaux. Cette voie est un phosphorelais, dans lequel il y a phosphorylation successive de HptB, HsbR et HsbA, dépendant de l'activation de HptB (Valentini et al., 2016). HptB peut être phosphorylé par trois senseurs différents, dont les signaux restent inconnus, SagS, ErcS et PA1611 (Lin et al., 2006; Mern et al., 2010; Petrova et Sauer, 2011). Ce dernier peut d'ailleurs inhiber RetS (Bhagirath et al., 2017), alors que HptB phosphorylé peut activer RetS (Bordi et al., 2010). Lorsque HptB est inactif, HsbR possède une activité kinase permettant la phosphorylation de HsbA, qui va activer HsbD. Cette dernière est une diguanylate cyclase permettant la production de c-di-GMP (Valentini et al., 2016). Très récemment, il a été montré que RpoS pouvait activer la transcription de *rsmY* lorsque HsbR était dans un état non-phosphorylé (Bouillet et al., 2019). Enfin, il a été montré que RsmA peut aller inhiber la traduction de SadC, empêchant ainsi la production de c-di-GMP (Moscoso et al., 2014).

3. Prophages et structures phagiques cryptiques

a. Bactériophages

Les bactériophages (« mangeurs de bactéries »), aussi appelés phages, ont été découverts en 1917 par Félix d'Hérelle (D'Hérelle, 1917). Leur recherche et leur utilisation (phagothérapie) se sont accélérées jusqu'à la découverte des antibiotiques par Fleming en 1928 et leur utilisation massive à partir de la seconde guerre mondiale, qui a supplanté la recherche sur ces virus

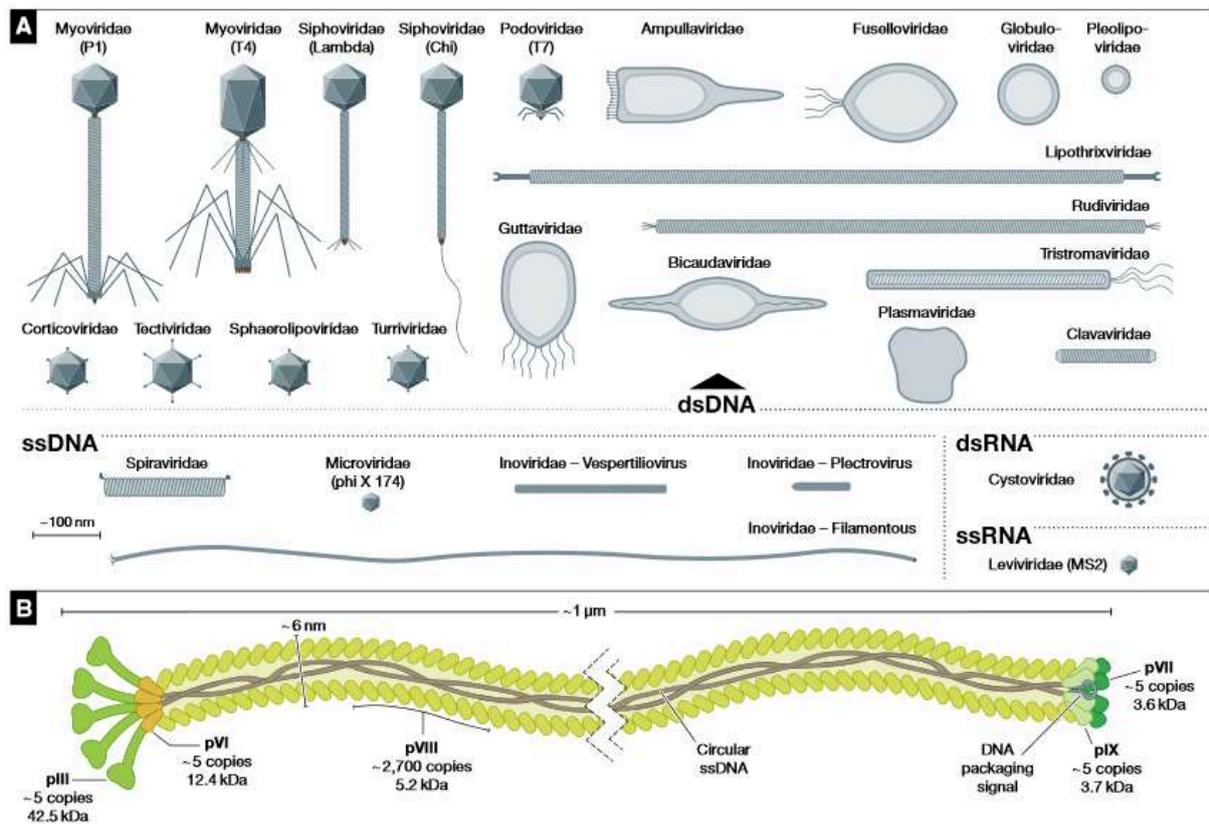


Figure 8. Morphologie des bactériophages, classés selon leur famille.

A. Classification et forme des bactériophages selon leur type d'acide nucléique (classification Baltimore). B. Représentation schématique du phage filamenteux Ff d'*Escherichia coli* (famille Inoviridae), (d'après Hay et Lithgow, 2019).

bactériens, en tout cas dans les pays occidentaux (exception faite de la Belgique qui reste en avance dans ce domaine, par comparaison à ses voisins). La guerre froide a amené les pays de l'Ouest à continuer la découverte de nouveaux antibiotiques, alors que les pays de l'Est ont, eux, préféré poursuivre la recherche et l'utilisation de ces bactériophages, la Géorgie en tête. Depuis le début des années 1990, l'augmentation croissante et incessante de l'antibiorésistance dans le monde a amené les chercheurs à s'intéresser de nouveau à ces phages pour essayer de trouver de nouvelles alternatives de traitements.

Cent années de recherche ont permis d'arriver à cette conclusion : les phages sont les organismes les plus nombreux sur Terre, avec un chiffre estimé à environ 10^{31} (Comeau et al., 2008). Cette estimation, difficilement imaginable, a été « traduite » en une donnée joliment imagée : il existerait 1000 milliards de phages par grain de sable sur Terre (Keen, 2015). La phagothérapie est une des alternatives très étudiée à l'utilisation d'antibiotiques. Néanmoins, de nombreux problèmes se posent, comme l'impact de ces phages sur les organismes eucaryotes (à cause des possibles interactions avec le système immunitaire, par exemple), la spécificité de ces phages (parfois souche-dépendante), mais également l'émergence de résistances de souches bactériennes à leur phage, comme pour les antibiotiques. Plusieurs mécanismes de résistances existent, comme la modification de la voie d'entrée du phage (mutations par exemple), les systèmes CRISPR-Cas ou encore les systèmes de restriction-modification (Rostøl et Marraffini, 2019).

La morphologie des phages est très variable, comme représentée en **figure 8A** (Hay et Lithgow, 2019). Ces parasites obligatoires se répliquent en détournant la machinerie cellulaire de la cellule cible à leur avantage. Les bactériophages à queue sont les plus communs, suivis des phages filamenteux (Famille Inoviridae). Ces derniers sont des phages un peu particuliers, car ils sont excrétés de la bactérie sans lyse de la bactérie hôte. Le représentant le plus étudié est le phage Ff d'*Escherichia coli* (**Figure 8B ; Hay et Lithgow, 2019**). Deux types de répllication sont possibles par un bactériophage tempéré lors d'une infection : lytique ou lysogénique. La répllication lytique va conduire à la lyse cellulaire après fabrication d'un très grand nombre de virions. Certains phages ne peuvent effectuer qu'un cycle lytique (phages lytiques). La répllication lysogénique va conduire le génome du phage à s'intégrer dans le génome bactérien, et à infecter durablement cette bactérie, puisque le génome phagique sera répliqué en même temps que le génome bactérien. De plus, cette bactérie sera protégée d'une nouvelle infection (« superinfection ») par ce phage (Doss et al., 2017). La décision du cycle infectieux est guidée par l'état nutritionnel dans lequel la bactérie croît, mais également par le

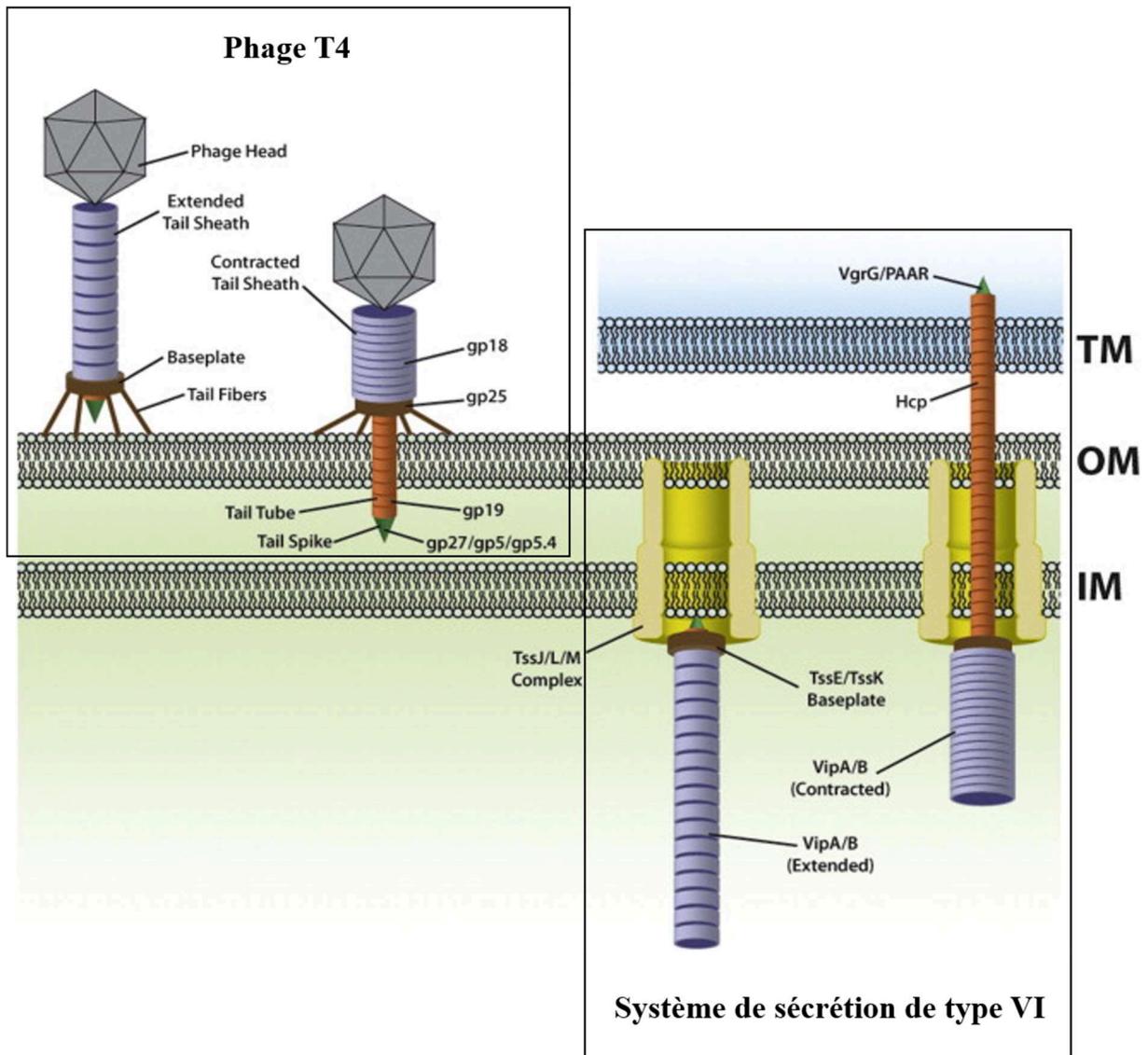


Figure 9. Homologies structurales entre le phage T4 et le système de sécrétion de type VI.

Les protéines ayant une homologie fonctionnelle sont représentées par le même code couleur sur les deux structures. TM : Target Membrane ; OM : Outer Membrane ; IM : Inner Membrane (Ho et al., 2014).

nombre de particules infectieuses présentes au moment de l'infection (**Zeng et al., 2010**). Très récemment, une publication a montré que cette décision pouvait également être guidée par un peptide de communication, ce qui suggère que les phages peuvent communiquer entre eux (**Erez et al., 2017**). Cette découverte majeure pourrait déboucher à l'avenir sur de nouvelles thérapies.

Les phages qui entrent dans un cycle de répllication lysogénique deviennent des prophages. Ces prophages redeviennent lytiques lorsque les conditions environnementales ne sont plus favorables à la survie de la bactérie. Les prophages constituent une des sources principales de nouveauté génétique, via les transferts de gènes horizontaux par transduction, ou parce qu'ils portent naturellement des gènes augmentant la virulence de la souche bactérienne. Par exemple, les souches de *Vibrio cholerae* pathogènes pour l'Homme portent toutes le prophage CTX Φ , la toxine responsable de la pathologie du choléra étant codée dans son génome. Les prophages sont également une des sources principales d'évolution, et les génomes bactériens portent la marque de nombreux prophages, qui cohabitent avec la bactérie par symbiose, ou qui ont perdu leur capacité à redevenir lytique (**Canchaya et al., 2003; Fortier et Sekulovic, 2013**). Ces prophages cryptiques sont largement utilisés par les bactéries, utilisant leurs gènes à leur avantage (**Canchaya et al., 2003**).

Chez *P. aeruginosa*, il existe plusieurs prophages ou prophages cryptiques, ou des structures ressemblant fortement à d'anciens phages.

b. Structures phagiques cryptiques

i. Système de sécrétion de type VI

Depuis sa description en 2006 (**Pukatzki et al., 2006**), le système de sécrétion de type VI (SST6) a été étudié de façon extensive. Ce système de sécrétion possède une aiguille pour injecter divers composés toxiques dans le cytoplasme de la cellule procaryote (majoritairement) ou eucaryote (minoritairement) à proximité (**Ho et al., 2014**).

Il a rapidement été établi des homologies structurales et fonctionnelles entre le SST6 et le phage T4 (**Figure 9 ; Ghequire et De Mot, 2014; Ho et al., 2014; Leiman et al., 2009**). Des protéines du SST6 possèdent une homologie structurale avec une ou plusieurs protéines du phage T4, comme VgrG et le complexe protéique phagique gp27/gp5/gp5.4, Hcp avec gp19 ou encore la gaine contractile formée par VipA/B et gp18/gp25 chez le phage T4 (**Ghequire et De Mot, 2014; Ho et al., 2014**). Il a été suggéré que le SST6 était un ancien prophage T4 qui aurait perdu sa capacité à s'exciser, conférant un avantage évolutif à la bactérie l'ayant intégré.

ii. Pyocines R2 et F2

Il existe trois types de bactériocines, nommées « pyocines », produites par *P. aeruginosa* : S, F et R. Les pyocines de type S sont des colicines-like. Six d'entre elles ont été identifiées chez *P. aeruginosa* : S1, S2, S3, S4, S5, S6 et AP41. Les pyocines de type F et R ont été nommées « tailocines ». Les pyocines de type R ressemblent aux queues inflexibles et contractiles des bactériophages (Ghequire et De Mot, 2014; Michel-Briand et Baysse, 2002). Seule la pyocine R2 est présente sur le génome de *P. aeruginosa*. Les pyocines de type F ressemblent aux queues flexibles et non contractiles des bactériophages (Ghequire et De Mot, 2014; Michel-Briand et Baysse, 2002). Seule la pyocine F2 est présente chez cette bactérie. Les pyocines sont exprimées lors de l'enclenchement de la réponse SOS chez *P. aeruginosa*. Si le résultat est similaire à une infection par les phages, à savoir la mort de la cellule cible, il existe une différence fondamentale entre une pyocine et un phage : la pyocine ne peut se répliquer dans la cellule cible, signifiant de fait que ce ne soit pas un parasite, et qu'aucun matériel génétique ne puisse être transmis (Ghequire et De Mot, 2014; Michel-Briand et Baysse, 2002).

Les deux clusters de gènes codant les pyocines F2 (PA0613-PA0627) et R2 (PA0632-PA0648) sont adjacents sur le génome de *P. aeruginosa*. En amont de ces deux clusters, se situent *prrN* (PA0610) et *prrR* (PA0611), deux gènes impliqués dans la régulation de la transcription des pyocines chez *P. aeruginosa*. PrtR est un répresseur se liant à la région promotrice de *prrN* qui code PrtN, l'activateur transcriptionnel des gènes codant des pyocines. L'activation de RecA lors de la réponse SOS permet le clivage de PrtR, et donc l'activation des gènes des pyocines (Ghequire et De Mot, 2014; Michel-Briand et Baysse, 2002). Le gène PA0612 code *ptrB*, un gène directement réprimé par PrtR, codant un répresseur du système de sécrétion de type III (Ghequire et De Mot, 2014; Wu et Jin, 2005).

La relation structurelle existante entre les pyocines F et R avec les bactériophages est évidente au regard de leurs structures. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la pyocine R2 était composée de gènes montrant des similarités avec le phage P2, et la pyocine F2 avec le phage λ (Nakayama et al., 2000). L'hypothèse, comme pour le SST6, est que ces prophages ont perdu leur capacité de répllication et ont co-évolué avec la souche bactérienne, qui les utilise désormais à son avantage, bien que le rôle des pyocines soit encore très mal connu (Ghequire et De Mot, 2014; Michel-Briand et Baysse, 2002; Nakayama et al., 2000).

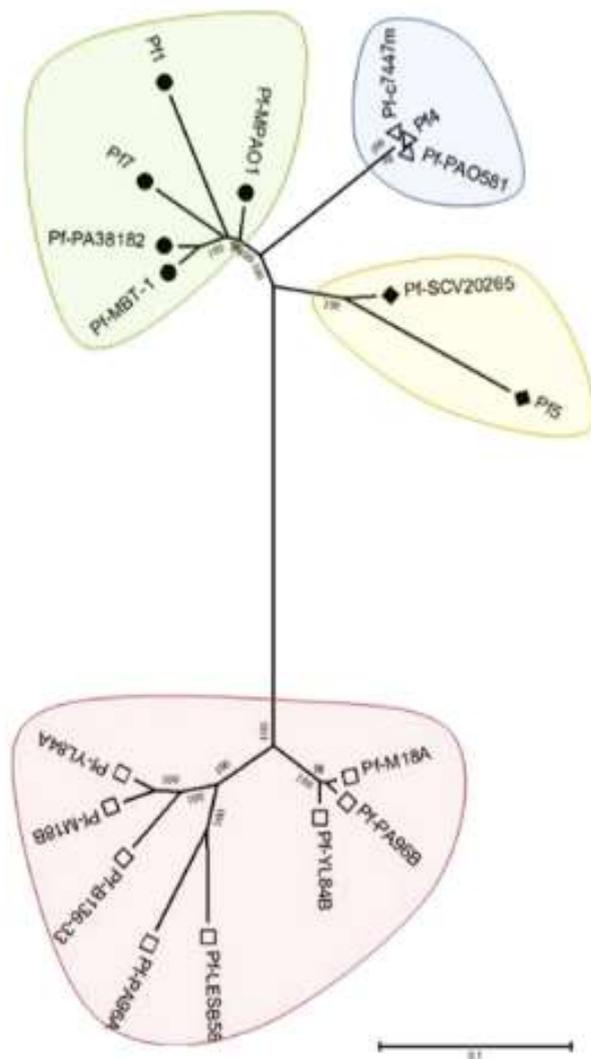


Figure 10. Relations entre les prophages Pfl-like et les souches bactériennes sur lesquelles ils sont retrouvés.

Arbre phylogénétique basé sur la séquence des prophages Pfl-like en fonction des génomes bactériens séquencés. Sont représentés les clades des souches portant le prophage Pf7 (vert), Pf4 (bleu), Pf5 (jaune) et Pf-LES (rouge) (Knezevic et al., 2015).

c. Prophages Pf1-like

Les phages Pf sont des phages filamenteux, de la famille des Inoviridae, portant un matériel génétique composé d'ADN simple brin. Le phage sauvage, Pf1 infectant la souche PAK, n'est pas capable de cycle lysogénique (Hill et al., 1991). Ces phages particuliers sont excrétés à travers l'enveloppe sans provoquer de lyse cellulaire. Il existe chez environ 50 à 60 % des souches de *P. aeruginosa*, des prophages appartenant à la famille Pf1, qui auraient co-évolué avec leur hôte respectif à partir d'un prophage ancestral (Burgener et al., 2019; Knezevic et al., 2015).

Il existe plusieurs grands clades de prophages de la famille des Pf, à savoir les clades Pf4, Pf5, Pf7, et Pf-LES (Figure 10 ; Knezevic et al., 2015). Même s'il existe un lien phylogénétique entre prophages d'un même clade, chaque souche bactérienne porte un prophage différent qui a co-évolué avec elle. Puisque 50 à 60% des souches de *P. aeruginosa* portent un prophage Pf1-like, il est possible de se questionner sur l'apport, d'un point de vue physiologique, de ces prophages à la bactérie, au vu de leur prévalence chez cette bactérie.

La seule étude globale sur les phages Pf est celle de Burgener et collaborateurs, qui ont très récemment montré que les phages Pf, tous types confondus, étaient associés à une infection chronique chez des patients atteints de mucoviscidose, à une fonction pulmonaire diminuée chez ces patients, ainsi qu'à une augmentation de la résistance aux antibiotiques à cause de leur séquestration par les phages (Burgener et al., 2019). En dehors de cette étude globale, seul le phage Pf4 (spécifique de la souche PAO1) et Pf5 (spécifique de la souche PA14) ont été étudiés ; le Pf4 étant le plus étudié à ce jour.

Le phage Pf4, dont la voie d'entrée est le pilus de type IV (Castang et Dove, 2012; Secor et al., 2015), contribue à de nombreux aspects de la physiologie de *P. aeruginosa* PAO1, tels que la virulence et le biofilm. En 2001, était étudiée pour la première fois chez *P. aeruginosa* PAO1 l'expression différentielle des gènes entre condition planctonique et condition biofilm. Cette étude a révélé que les gènes les plus surexprimés en condition biofilm étaient les gènes du prophage Pf4 (Whiteley et al., 2001). De plus, une augmentation d'expression des gènes de ce prophage a aussi été observée dans des conditions anaérobies à pH 6,5, imitant les conditions retrouvées dans un poumon à un stade avancé de mucoviscidose (Platt et al., 2008). Enfin, il a été noté que certaines protéines relatives au phage Pf4 étaient retrouvées en plus grande abondance lors de l'adhésion de *P. aeruginosa* sur l'acier inoxydable et le verre, mais pas sur le polystyrène (Guilbaud et al., 2017). Les phages Pf4 sont importants pour la formation, la

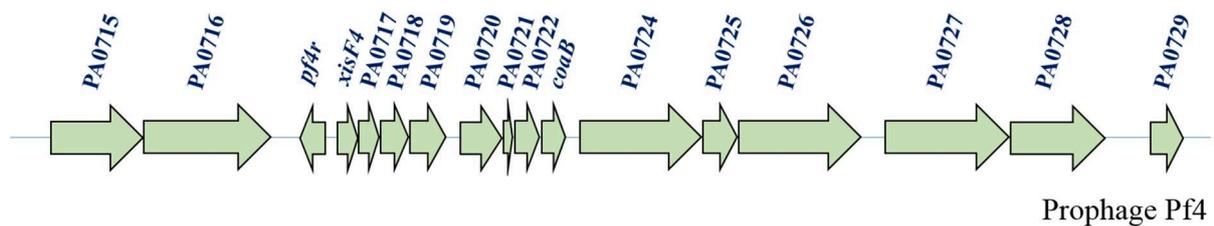


Figure 11. Organisation génomique du prophage Pf4.

La majorité des gènes codent des protéines hypothétiques. Le gène *pf4r* code une protéine servant à l'immunité. Le gène *xisF4* code pour une excisionase. Le gène *coaB* code la protéine majoritaire de la capsid du phage. Autre particularité : la présence d'une reverse transcriptase (PA0715) sur le génome du prophage, jamais décrit chez un phage à ADN simple brin (Hay et Lithgow, 2019; www.pseudomonas.com).

structuration et la dispersion du biofilm. Il a été montré que, de par leurs propriétés physico-chimiques, les phages filamenteux Pf4 pouvaient s'auto-organiser au sein d'une matrice de biofilm dans un arrangement de cristaux liquides visqueux, permettant une augmentation de l'adhésion aux mucines et aux surfaces, ainsi qu'une résistance accrue aux antibiotiques (notamment les aminoglycosides) et à la dessiccation (**Secor et al., 2015**). Une souche délétée de l'ensemble des gènes codant le prophage Pf4 est altérée dans le développement et la stabilité du biofilm (**Rice et al., 2009**). Enfin, ce phage est responsable, au moins en partie, de la dispersion des cellules au sein des microcolonies de biofilm. Un mutant de délétion de ce phage ne permet plus l'observation de cellules lysées au centre des microcolonies, et un ajout exogène de ce phage sur un biofilm préformé du mutant phagique permet de retrouver cette lyse cellulaire (**Rice et al., 2009**). Ce résultat étonnant, étant donné que les phages filamenteux ne provoquent normalement pas de lyse cellulaire, a été en partie expliqué. Il a été montré que ce phage est responsable de lyse cellulaire via l'émergence d'une forme superinfective du Pf4 au sein des microcolonies de biofilms âgés (au-delà de 5 jours en conditions dynamiques), amenant à cette lyse (**Webb et al., 2004, 2003**). Cette forme superinfective apparaît à cause de mutations au sein du prophage Pf4, localisées dans la région hypermutatrice du répresseur C, dont le gène a récemment été nommé *pf4r* (**Figure 11 ; Hay et Lithgow, 2019; Li et al., 2019; McElroy et al., 2014**). Il a été montré que dans un mutant $\Delta mutS$, qui code la protéine MutS, impliquée dans la réparation des mésappariements lors de la réplication de l'ADN et omise par le système de relecture de l'ADN polymérase, la forme superinfective des Pf4 émerge de façon rapide et spontanée (**Martínez et Campos-Gómez, 2016**). OxyR, le régulateur majeur de la réponse au stress oxydatif chez *P. aeruginosa*, a été montré comme pouvant se lier au milieu de *pf4r* (**Wei et al., 2012**). Un mutant $\Delta oxyR$ résulte en l'apparition plus rapide et une production plus importante de la forme superinfective du Pf4, tout comme le traitement d'un biofilm par un agent mutagène, tel que le NO ou le H₂O₂. A l'inverse, un mutant $\Delta recA$, qui est important dans la réparation de l'ADN lors de la réponse SOS, montre un retard de l'apparition et une diminution de la production de ce phénotype superinfectif. L'ensemble de ces résultats a permis l'émergence d'un modèle sur l'apparition de la forme superinfective du Pf4. Au centre des microcolonies du biofilm, s'accumulent des ROS, qui pourraient ainsi entraîner une hypermutation de *pf4r* ou de son promoteur, levant la répression exercée par ce régulateur et permettant la production des particules phagiques. RecA, via la réponse SOS, pourrait favoriser la production de ces particules phagiques superinfectives, alors qu'OxyR, et MutS, via le système de réparation des mésappariements, pourraient inhiber cette production. Cette forme superinfective pourrait ensuite, de fait, infecter certaines cellules environnantes, même si le

prophage est présent au sein de leur génome (**Hui et al., 2014**). Il existe d'autres régulateurs de l'apparition de la forme superinfective du Pf4 chez cette bactérie. Par exemple, il a été montré que MvaT/MvaU était capable de réprimer les gènes du prophage Pf4 (**Castang et Dove, 2012**). Plus spécifiquement, Li et collaborateurs ont montré que ces deux protéines histones-like pouvaient réprimer l'expression de *xisF4*, une excisionase retrouvée en aval de *pf4r*, et responsable de l'excision du prophage et de l'induction du gène PA0727 qui permet la réplication de l'ADN phagique, ces deux événements amenant à la production du phage. De plus, il a été montré que Xisf4 pouvait réprimer l'expression de *pf4r*, et Pf4r l'expression de *xisF4* (**Li et al., 2019**). Un autre régulateur est BfmR, décrit précédemment dans ce manuscrit (voir partie ADN extracellulaire). Lorsque son senseur BfmS perçoit de l'ADN extracellulaire, il active BfmR, qui va réguler positivement l'expression de *phdA* (prevent-host-death protein A, PA0691). La protéine PhdA va pouvoir ensuite inhiber l'expression des gènes du prophage Pf4 et empêcher la lyse cellulaire et le relargage d'ADN extracellulaire (**Petrova et al., 2011**).

Si les mécanismes d'apparition de la forme superinfective du phage Pf4 sont maintenant connus, le mécanisme par lequel cette forme superinfective amène à un phénomène de lyse cellulaire n'est toujours pas décrit. En revanche, les cellules dispersées grâce à la lyse cellulaire liée à la forme superinfective du Pf4 présentent une plus grande capacité d'adhésion, et un réseau très dense de phages filamenteux autour de leurs cellules qu'elles produisent elles-mêmes. De plus, ces cellules forment des variants (SCV), qui sont des colonies présentant une taille beaucoup plus petite que les colonies sauvages, et un comportement phénotypique particulier et différent des colonies sauvages. L'ajout de Pf4 superinfectif à une culture planctonique de *P. aeruginosa* amène à l'apparition de ces SCV et à l'augmentation de l'adhésion des cellules, phénotypes observés chez les cellules dispersées. Ceci suggère que ces Pf4 superinfectifs seraient une des causes de l'apparition de ces variants morphotypiques (**Webb et al., 2004**).

Un autre aspect de la physiologie que le phage Pf4 modifie chez son hôte, c'est sa virulence. Il a été montré lors de l'étude de Rice et collaborateurs, que la délétion du prophage entier provoque une diminution de la virulence sur un modèle de pneumonie aiguë murin (**Rice et al., 2009**). Le phage Pf4 empêche la dissémination de *P. aeruginosa* à partir du poumon, via une augmentation de l'adhésion à la mucine des bactéries, et un piégeage des bactéries dans le poumon. La production du phage Pf4 a également été associée avec une réduction de l'inflammation par réduction du recrutement des neutrophiles et une diminution du taux de cytokines, ainsi qu'une diminution de la phagocytose des bactéries par les macrophages. Ces

résultats suggèrent que les phages Pf4 promeuvent une infection chronique plutôt qu'aigüe (Secor et al., 2016), bien que la présence de ce prophage dans le génome soit nécessaire pour permettre les infections aiguës (Rice et al., 2009). Ces deux résultats contradictoires demandent à être précisés lors d'études futures. Il a également été montré, cette fois-ci sur un modèle murin de blessure cutanée, que les phages Pf4 pouvaient être reconnus par les leucocytes, permettant ainsi une réponse immunitaire antivirale inhibant de fait la phagocytose bactérienne et prévenant l'élimination des bactéries. Ce phénomène a également été observé chez un modèle de leucocytes humains. Cependant, cette fonction a été proposée comme pouvant être utilisée contre *P. aeruginosa*, car il est alors possible d'utiliser ces phages Pf4 comme vaccin. En effet, les anticorps produits contre ces phages Pf4 permettaient de prévenir la colonisation de *P. aeruginosa* au niveau de la blessure (Sweere et al., 2019). Cela pourrait être une nouvelle piste thérapeutique prometteuse.

Enfin, ce phage est impliqué dans la compétition inter-espèce pour la colonisation de nouvelles niches écologiques. En effet, le phage Pf4 permet d'inhiber le biofilm d'*Aspergillus fumigatus*, champignon fréquemment retrouvé dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, par inhibition de son activité métabolique. De la même façon, le Pf4 permet d'inhiber le biofilm et la croissance planctonique de *Candida albicans*, une levure également retrouvée dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Le mécanisme sous-jacent entre ces deux résultats semble être le même : le phage pourrait capturer le fer, et ainsi priver les autres micro-organismes de cette ressource essentielle à la croissance. De manière intéressante, une infection par le Pf4 réduit la production de pyoverdine de *P. aeruginosa* (Nazik et al., 2017; Penner et al., 2016; Secor et al., 2017). La pyoverdine étant un des sidérophores principaux chez cette bactérie, dont la production est inhibée lors d'une abondance en fer, ces résultats suggèrent que le phage pourrait séquestrer le fer, et l'incorporer dans la cellule lors du processus infectieux. Cette hypothèse reste à être démontrée.

Le Pf4 remplit donc de nombreux rôles physiologiques chez *P. aeruginosa*, ce qui pourrait expliquer que cette bactérie tolère la présence de ce prophage, répliatif et potentiellement infectieux, dans son génome.

Le Pf5, présent lui chez *P. aeruginosa* PA14, a été beaucoup moins étudié que le Pf4. Il a été montré que ce phage, relativement proche du Pf4, n'était pas impliqué dans la formation des SCV, contrairement au Pf4 (Mooij et al., 2007). De plus, le Pf5 pourrait inhiber la formation de biofilm. En effet, un mutant $\Delta dppA1$, codant une protéine impliquée dans la reconnaissance et la liaison des substrats du transporteur ABC DppBCDF, montre une diminution de la

formation de biofilm, une surexpression de 10 gènes appartenant tous au locus Pf5, et une surproduction de phages Pf5. Lorsque trois gènes essentiels de ce Pf5 sont mutés, une augmentation de la formation de biofilm est observée (**Lee et al., 2018**).

L'ensemble de ces données suggère des effets physiologiques pouvant être très différents entre prophages, pourtant relativement proches d'un point de vue génétique.

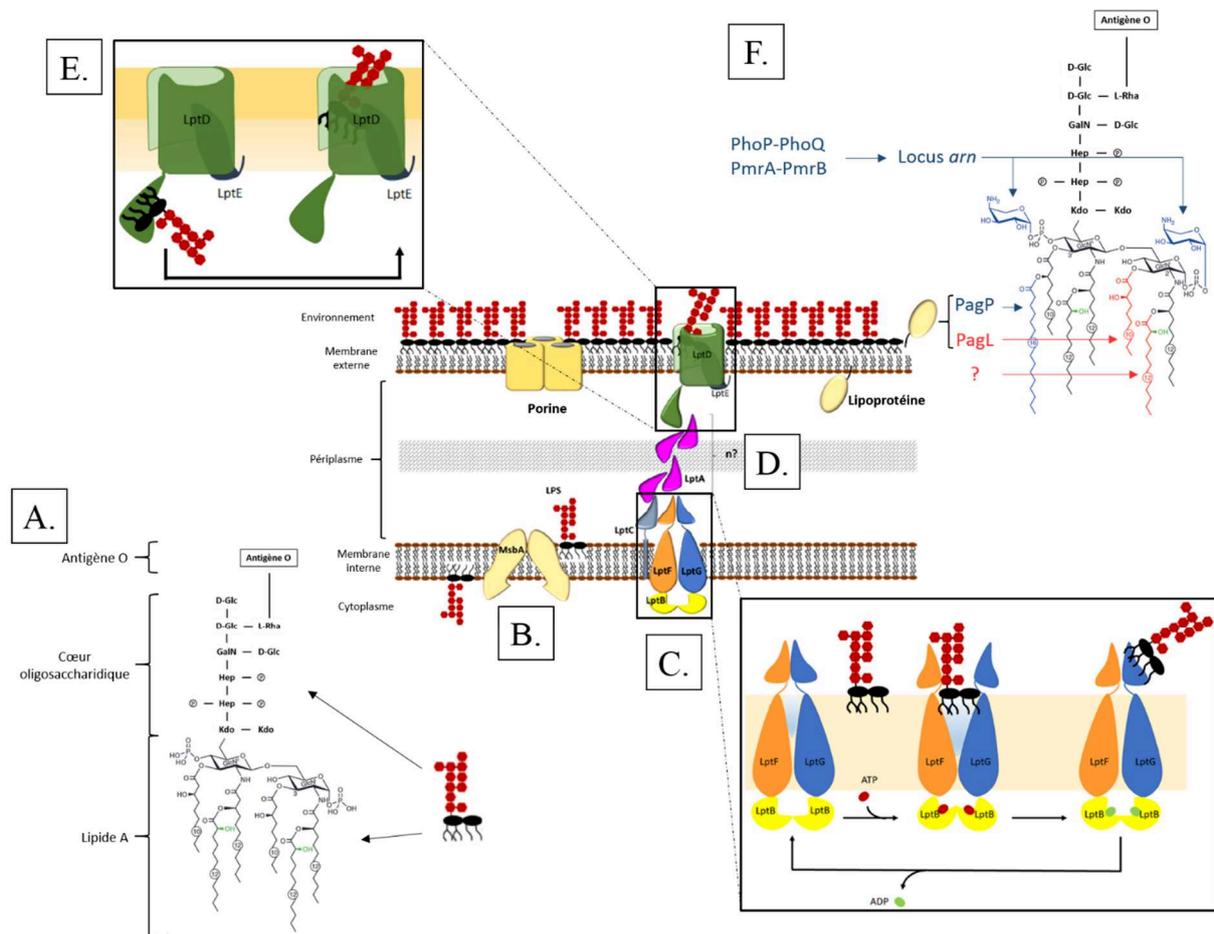


Figure 12. Structure, transport et modification du LPS de *P. aeruginosa*.

A. Structure du LPS de *P. aeruginosa*. B. Passage du LPS la face cytoplasmique à la face périplasmique via l'action de la flippase MsbA. C. Prise en charge du LPS par le complexe LptBCFG. D. Transport du LPS à travers le périplasm par la protéine périplasmique LptA (LptH chez *P. aeruginosa*). E. Passage de la face périplasmique à la face extérieure de la membrane externe du LPS via le complexe LptDE. F. Modifications du lipide A par les lipoprotéines PagP (bleu) et PagL (rouge), et ajout des dérivés saccharidiques sur le phosphate (bleu) via le locus *arn*, sous l'action des systèmes à deux composants PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB. ⊕ : Groupement phosphate ; GlcN : Glucosamine ; Kdo : Acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique ; Hep : Heptose ; GalN : Galactosamine ; D-Glc : D-glucose ; L-Rha : L-Rhamnose (schéma adapté de King et al., 2009; Sperandio et al., 2017).

II. Enveloppe de *Pseudomonas aeruginosa*

1. Structure et fonction

Comme toute bactérie à Gram négatif, l'enveloppe de *P. aeruginosa* est composée d'une double membrane, interne et externe, et d'un fin peptidoglycane situé dans un compartiment propre aux bactéries à Gram négatif : le périplasme.

a. Membrane externe

La membrane externe est une membrane asymétrique, c'est-à-dire qu'elle est composée au niveau de son feuillet interne d'une couche de phospholipides, et au niveau de son feuillet externe d'une couche de phospholipides et de lipopolysaccharides (LPS). Cette couche de LPS étant en contact direct avec son environnement, elle offre à la bactérie une barrière de sélectivité et de perméabilité. En plus de ces feuillets, la membrane externe est composée d'une multitude de lipoprotéines et de protéines transmembranaires, dont la plupart sont des porines, des canaux permettant le passage de nombreuses molécules à travers cette membrane. La particularité de cette membrane externe est d'être très peu perméable, représentant seulement 8% de celle d'*E. coli*, ce qui contribue à sa haute résistance aux antimicrobiens. Cette faible perméabilité peut être expliquée par l'absence de larges porines générales de diffusion non spécifiques chez *P. aeruginosa*, telles qu'OmpF ou OmpC chez *E. coli* (Chevalier et al., 2017).

i. Lipopolysaccharides

Le LPS est un important facteur de virulence chez *P. aeruginosa*. En plus de protéger par une barrière physique la bactérie face aux agressions de l'environnement ou de l'hôte, il permet l'interaction entre la bactérie et les récepteurs des cellules de l'hôte, et agit également comme une endotoxine. Il va donc initier certains événements qui vont endommager les cellules hôtes, et déclencher une réponse inflammatoire sévère, ou bien empêcher la reconnaissance de la bactérie par les cellules immunitaires, dans le cadre d'infections chroniques. La structure de ce LPS est assez variable, selon les conditions environnementales. Dans la majorité des cas, il est constitué de trois parties : le lipide A, un cœur oligosaccharidique et un antigène O. Ce dernier est parfois absent, selon la configuration du cœur oligosaccharidique (Figure 12A ; King et al., 2009).

Le lipide A est constitué d'un disaccharide composé de glucosamines reliées en β 1→6, sur lequel sont attachées plusieurs chaînes d'acides gras (AG) s'ancrant dans la membrane, ainsi

qu'un groupement phosphate par unité de glucosamine. La **Figure 12A** représente le lipide A typique de *P. aeruginosa*, qui peut être hydroxylé ou pas à deux endroits (représentés en vert, **Figure 12A**). Ce domaine est responsable de la réponse inflammatoire via les récepteurs Toll-like humains (TLR4) (**King et al., 2009**).

Le cœur oligosaccharidique est constitué de plusieurs sucres, pouvant être phosphorylés sur trois sites différents, ce qui en fait le cœur oligosaccharidique le plus phosphorylé des bactéries à Gram négatif (**Figure 12A**). Cette particularité permet l'interaction entre groupements phosphates chargés négativement de différentes molécules de LPS avec des cations divalents, et ainsi créer une « barrière ionique » à la surface, stabilisant le LPS et la membrane externe. Un autre cœur oligosaccharidique peut être synthétisé, et ne permet pas la liaison à un antigène O. La différence est que le L-rhamnose se lie à un autre D-glucose, à la place de l'antigène O (**King et al., 2009**).

L'antigène O est la troisième partie du LPS, et permet la protection contre la phagocytose et la résistance à la lyse par le complément. C'est également cet élément qui est responsable de la réponse antigénique de l'hôte. Il existe deux types de polysaccharides O. Le premier est dénommé le polysaccharide O commun, ou bande A, est non-antigénique, et est composé d'un long homopolymère de D-rhamnose (environ 70 résidus), produits par la grande majorité des souches de *P. aeruginosa*. Le deuxième est dénommé antigène spécifique O, ou bande B. Cet antigène O est extrêmement variable, composé de répétitions d'une série d'oses de nature différente. Il permet la détermination des sérotypes de *P. aeruginosa*, notés O1 à O20, dépendants de la structure et la composition de l'antigène O. Le sérotype de la souche PAO1 est O5, et est composé d'une répétition d'un trisaccharide composé d'acide 2-acétamido-3-acétamidino-2,3-didésoxy-D-mannuronique, d'acide 2,3-diacétamido-D-mannuronique, et de 2-acétamido-2,6-didésoxy-D-galactose (**King et al., 2009**).

La synthèse du LPS se déroule en deux temps : le lipide A et le cœur oligosaccharidique sont synthétisés dans le cytoplasme, et l'antigène O est synthétisé dans le périplasme, où il sera transféré sur le cœur saccharidique. Le LPS est intégré via le lipide A dans la face cytoplasmique de la membrane interne, et doit donc être exporté sur la face extérieure de la membrane externe via des transporteurs. Le premier est MsbA, une flippase qui permet au LPS de se retrouver sur la face périplasmique de la membrane interne (**Figure 12B**). L'antigène O sera alors transféré sur le cœur oligosaccharidique. Un complexe prend ensuite le relais, formé des protéines LptB, C, F et G. Ce complexe permet d'extraire le LPS de la membrane pour l'intégrer sur une des extensions périplasmiques de LptF ou LptG. Cela nécessite de l'énergie,

fournit par LptB (**Figure 12C ; King et al., 2009**). Le rôle de LptC a été récemment décrit, et serait une protéine qui recevrait le LPS de LptG pour le transmettre ensuite à LptA (**Okuda et al., 2016**). Le LPS est ensuite transporté sur différentes protéines LptA (le nombre exact est inconnu) à travers le périplasme jusqu'à atteindre LptD (**Figure 12D**). Le canal transmembranaire LptD associé à LptE, vont enfin exporter le LPS sur la face extérieure de la membrane externe (**Figure 12E ; King et al., 2009**). Il est important de mentionner que ce modèle a été décrit chez *E. coli*, mais qu'il existe des homologues de l'ensemble de ces protéines chez *P. aeruginosa* (**Sperandeo et al., 2017**). Cependant, la nomenclature diffère pour LptA, l'homologue chez *P. aeruginosa* étant LptH (PA4460). Chez *P. aeruginosa*, LptA (PA0005) est une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse du glycérol, notamment impliqué dans la synthèse des AG. De plus, de nombreuses lipoprotéines chez *P. aeruginosa* sont dénommés « Lpt », pouvant créer des confusions. Ainsi, pour chaque protéine impliquée dans le transport du LPS, le nombre PA est indiqué dans la liste suivante : LptB (PA4461) ; LptC (PA4459) ; LptF (PA3828) ; LptG (PA3827) ; LptD (PA0595) et LptE (PA3988) (www.pseudomonas.com).

Sous l'influence de conditions environnementales, comme des conditions limitantes en magnésium par exemple, le LPS peut être largement modifié. Le lipide A peut ainsi être dé-acétylé au niveau du deuxième résidu glucosamine (chaînes d'AG représentées en rouge, **Figure 12F**). La première chaîne peut être enlevée grâce à l'action de la lipoprotéine PagL (cette modification représente 75% des lipides A des souches de laboratoire), et la deuxième par une protéine inconnue, bien qu'il soit soupçonné que PagL puisse être aussi impliquée. Le lipide A peut également être pourvu d'une chaîne d'AG supplémentaire sur le premier résidu glucosamine, ajouté par la lipoprotéine PagP (chaîne d'AG représentée en bleu, **Figure 12F**). Enfin, la synthèse et l'ajout d'un résidu 4-amino-4-deoxy-L-arabinose sur les phosphates liés aux résidus galactosamine sont réalisés par les produits du locus *arnBCADTEF*, sous le contrôle des TCS PhoQ-PhoP et PmrB-PmrA (résidus en bleu, **Figure 12F ; King et al., 2009**).

ii. Canaux

Il existe 26 porines chez *P. aeruginosa*, ainsi que différents récepteurs permettant l'incorporation du fer, notamment.

❖ Récepteurs TonB-dépendants

Ces récepteurs sont généralement associés aux fonctions d'acquisition du fer, mais sont également impliqués dans l'acquisition de la vitamine B₁₂, du nickel ou des carbohydrates. Ce sont des canaux formés par un large tonneau β , et fermés par un bouchon globulaire protéique

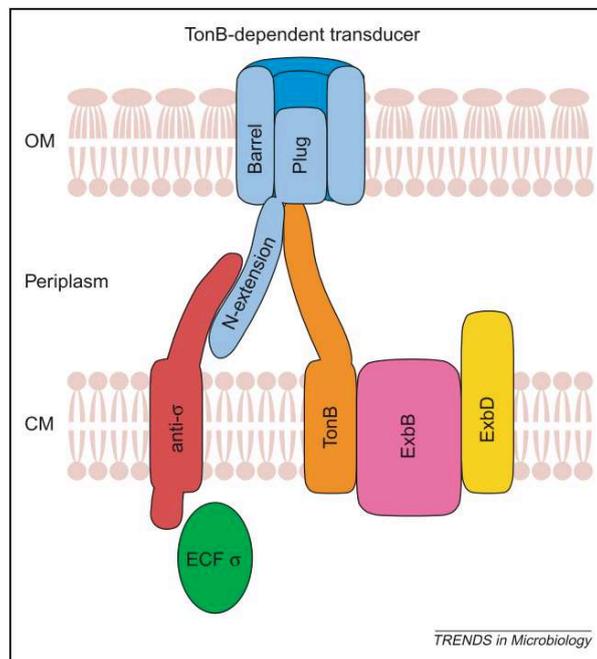


Figure 13. Modèle du système de signalisation de surface de Koebnik.

Le récepteur / transducteur (bleu), interagit avec le système énergisant TonB-ExbB-ExbD d'un côté, et avec un facteur anti-sigma séquestrant un facteur sigma ECF de l'autre (**Koebnik, 2005**).

empêchant la diffusion de molécules non-spécifiques à travers la membrane. L'ouverture de ces canaux via un changement de conformation du bouchon protéique nécessitant un apport d'énergie, ces récepteurs sont couplés à un système TonB-ExbB-ExbD. ExbB-ExbD forment un complexe dans la membrane interne, qui utilise la force proton-motrice pour fournir de l'énergie au système. Cet apport d'énergie entraîne un changement de conformation de TonB, dont l'extrémité C-terminale interagit avec l'extrémité N-terminale du récepteur, entraînant un changement de conformation du récepteur et du bouchon, permettant ainsi l'incorporation de la molécule dans la cellule (**Braun et Endriß, 2007; Llamas et al., 2014; Noinaj et al., 2010**).

Parfois, ce complexe est couplé à un système de transduction de signaux au sein de la cellule via un facteur σ ECF. On parle alors de récepteur / transducteur TonB-dépendant. Le changement de conformation du récepteur induit par TonB permet l'interaction de l'extrémité N-terminale du récepteur avec un facteur anti- σ . Cette interaction va provoquer la protéolyse du facteur anti- σ , permettant ainsi le relargage du facteur σ ECF qu'il séquestrait jusqu'alors. Ce système de signalisation de surface (CSS), modélisé par Koebnik (**Koebnik, 2005**), permet ainsi, dans le cas des systèmes d'acquisition du fer, de coupler l'incorporation de ce dernier avec une signalisation permettant d'activer la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores et de leurs transporteurs (**Figure 13 ; Koebnik, 2005; Llamas et al., 2014**).

Il existe plusieurs récepteurs selon les types de sidérophores produits. On peut citer par exemple FpvA, le récepteur de la ferripyoverdine, FptA, le récepteur de la pyochéline-Fe³⁺ (qui n'appartient pas à un système de signalisation de surface), ou encore PhuR et HasR, deux récepteurs impliqués dans l'incorporation de l'hème. *P. aeruginosa* possède également des récepteurs capables de reconnaître des sidérophores produits par d'autres espèces (xénosidérophores), comme la ferrioxamine, le ferrichrome ou la ferrimycobactine, et de les incorporer. Ce « piratage » implique les systèmes Fiu, Fox, Fem et Fec, qui appartiennent tous à des CSS (**Cornelis et Dingemans, 2013; Llamas et al., 2014**).

❖ Porines spécifiques

25 des 26 porines de *P. aeruginosa* sont des porines spécifiques. Ces porines sont formées par des tonnelets de feuillet β , la largeur du pore étant définie par le nombre de feuillet β . Les 25 porines sont listées dans le **tableau 2** (**Chevalier et al., 2017**).

Avec respectivement 25,2 et 21,6 kDa, OprG et OprH sont les deux porines ayant les poids moléculaires les plus faibles. OprG est une porine prédite pour permettre le passage d'ions Fe²⁺,

Nom de la porine	Nombre PA du gène	Fonction	Régulateurs / facteurs sigma	
OprB	PA3186	Incorporation du glucose	Anr, GltR / RpoS, SigX	
OprB2	PA2291		?	
OprG	PA4067	Incorporation putative du Fe ²⁺	Anr / SigX, FecI	
OprH	PA1178	Stabilisation de la membrane externe	PhoP-PhoQ, BrlR, BqsR, CarR / RpoS, FecI, SigX	
OprP	PA3279	Incorporation du phosphate	PhoB, TctD / RpoH, RpoS	
OprO	PA3280	Incorporation des polyphosphates		
Famille OccD	OprD (OccD1)	PA0958	Incorporation des acides aminés basiques et dipeptides basiques	ArgR, CzcR / RpoN, SigX, FliA
	OpdC (OccD2)	PA0162	Incorporation de l'arginine et de l'histidine	? / SigX, FliA
	OpdP (OccD3)	PA4503	Incorporation du glycine-glutamate et de l'arginine	? / RpoN, SigX
	OpdT (OccD4)	PA2505	Incorporation de la tyrosine	?
	OpdI (OccD5)	PA0189	Incorporation de l'arginine	
	OprQ (OccD6)	PA2760	Incorporation de l'arginine	MexT / RpoS, SigX
	OpdB (OccD7)	PA2700	Incorporation de la proline et de l'arginine	
	OpdJ (OccD8)	PA2420	Incorporation de l'arginine	?
	OpdK (OccK1)	PA4898	Incorporation de l'acide vanillique et du benzoate	
	OpdF (OccK2)	PA0240	Incorporation du glucuronate	
	OpdO (OccK3)	PA2113	Incorporation du pyroglutamate	? / SigX
Famille OccK	OpdL (OccK4)	PA4137	Incorporation du phénylacétate	?
	OpdH (OccK5)	PA0755	Incorporation du cis-aconitate et des tricarboxylates	TctD / ?
	OpdQ (OccK6)	PA3038		NarX-NarL / SigX
	OpdD (OccK7)	PA1025		?
	OprE (OccK8)	PA0291	?	IHF, OxyR / SigX, RpoN, FecI ₂
	OpdG (OccK9)	PA2213		PA2206 / ?
	OpdN (OccK10)	PA4179		
	OpdR (OccK11)	PA3588		?

Tableau 2. Liste des porines substrats-spécifiques de *P. aeruginosa*, leurs fonctions et leurs régulateurs et facteurs sigma associés.

Les anciennes et nouvelles dénominations des porines de la famille Occ sont mentionnées (sans et entre parenthèses, respectivement). Les facteurs sigma ont été considérés comme pouvant réguler chaque porine sur la base de données de RNA-Seq, ou de Chip-Seq ou de la présence du motif de liaison du facteur sigma devant le gène considéré (adapté de (Chevalier et al., 2017; Schulz et al., 2015)).

et est surexprimée en réponse à des conditions anaérobies. OprH est une porine surexprimée en réponse à une basse concentration en Mg^{2+} via le système PhoQ-PhoP. Cette surexpression, ainsi que l'induction de l'opéron *arn* modifiant le LPS (voir précédemment), permet une résistance augmentée à la polymyxine B. Les 23 autres porines ont des poids moléculaires compris entre 44,3 et 53 kDa. OprB et OprB2 sont des porines permettant l'incorporation du glucose. OprB a été montrée comme ayant un lien probable avec la virulence, car elle est surexprimée lors d'une exposition aux cellules épithéliales respiratoires humaines. OprP et OprO sont des porines impliquées dans l'incorporation du phosphate et des polyphosphates, respectivement. Elles sont surexprimées lors de conditions limitantes en phosphate (**Chevalier et al., 2017**).

Les 19 protéines restantes appartiennent à la famille d'OprD, et peuvent chacune incorporer des petites molécules, inférieures à 200 Da. La nomenclature de ces porines a été modifiée (Occ pour outer membrane carboxylate channel), et elles ont été réparties en deux familles phylogénétiques distinctes : OccD, comprenant 8 membres, impliqués dans l'incorporation des acides aminés basiques, et OccK, comprenant 11 membres, impliqués dans l'incorporation de molécules cycliques chargées négativement. OprD (OccD1) est la seconde porine majoritaire dans la membrane externe de *P. aeruginosa* et est très étudiée du fait de son implication dans le transport de l'imipénème et du méropénème. Sa non-expression entraîne ainsi une résistance à ces deux antibiotiques (**Chevalier et al., 2017**).

L'expression de ces porines est contrôlée par de nombreux régulateurs parmi lesquels de nombreux facteurs σ (**Tableau 2**). Cela implique donc que ces porines sont régulées en fonction des conditions environnementales dans lesquelles évolue la bactérie. Parmi ces facteurs σ , SigX, et dans une moindre mesure RpoS et RpoN, sont impliqués dans la régulation de nombreuses porines (**Chevalier et al., 2017; Duchesne et al., 2013; Fléhard et al., 2018**).

❖ Porine aspécifique : OprF

La 26^{ème} porine, et la seule porine aspécifique de *P. aeruginosa*, est OprF, l'homologue d'OmpA chez *E. coli*. C'est la porine majoritaire retrouvée chez cette bactérie, possédant des effets pléiotropes. Elle pourrait permettre le passage d'ions et de sucres à bas poids moléculaire, et il a été suggéré qu'elle pouvait être impliquée dans le passage du toluène, des nitrites et nitrates, ou encore dans l'incorporation du fer via des sidérophores (**Chevalier et al., 2017**).

OprF possède deux conformations bien distinctes. Elle peut former un petit canal, composé d'un domaine N-terminal transmembranaire (8 feuilletts β) relié par une région riche en cystéine

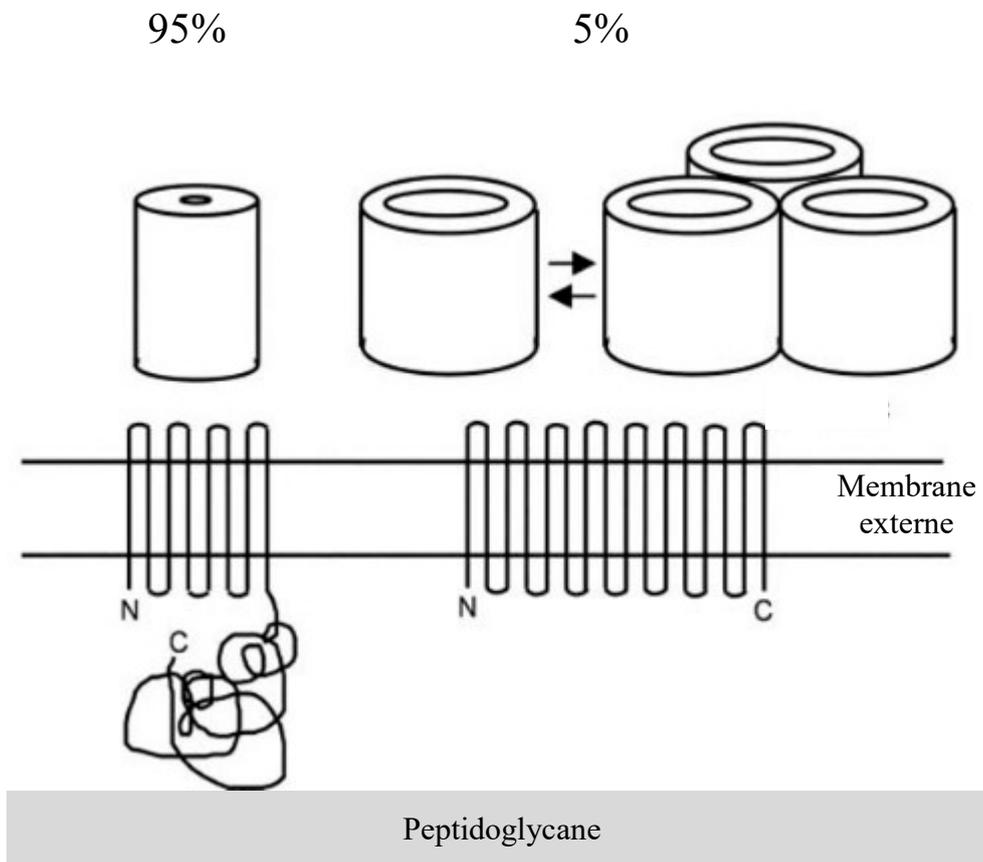


Figure 14. Conformations d'OprF.

La conformation fermée d'OprF (à gauche) est largement majoritaire au sein de la cellule (95%), et est supposée s'accrocher au peptidoglycane, via le domaine C-terminal. La conformation ouverte d'OprF (à droite) est très minoritaire dans la cellule (5% maximum), mais pourrait se trimériser (adapté de **Sugawara et al., 2006**).

à un domaine C-terminal périplasmique dont la structure secondaire (hélices α ou feuilletts β) est encore incertaine. Dans cette conformation majoritaire, OprF forme un canal fermé dans la membrane externe. La seconde conformation repose sur la structuration de la protéine complète en un seul domaine membranaire comprenant entre 14 et 16 feuilletts β . Sous cette forme minoritaire (moins de 5% des conformations), il peut y avoir trimérisation de la protéine et ouverture transitoire du canal. La faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* peut donc être également s'expliquer en partie par ce faible taux d'ouverture d'OprF (**Figure 14 ; Chevalier et al., 2017; Nestorovich et al., 2006; Sugawara et al., 2012, 2006**).

Il a été suggéré que le domaine C-terminal d'OprF pouvait s'accrocher au peptidoglycane, contribuant au maintien de la stabilité pariétale. En effet, un mutant $\Delta oprF$ est altéré dans sa morphologie cellulaire, et apparaît plus rond et plus petit que la souche sauvage. De plus, sa perméabilité et sa croissance en milieu de faible osmolarité sont altérées (**Chevalier et al., 2017; Rawling et al., 1998**). Il a également été montré qu'OprF pouvait se lier, via son domaine C-terminal, au domaine C-terminal d'OprI et d'OprL, deux lipoprotéines homologues à Lpp et Pal d'*E. coli*, respectivement (**Navare et al., 2015**). Ces dernières ont été montrées comme pouvant se lier à OmpA, et ainsi contribuer au maintien de l'intégrité membranaire chez *E. coli* (**Cascales et al., 2002**). Il est donc suggéré que ce même mécanisme pouvait avoir lieu chez *P. aeruginosa*.

OprF est également capable de se lier à l'interféron gamma, une cytokine produite par les cellules immunitaires de l'hôte. Cette liaison provoque une cascade de régulation induisant le système Rhl et, au final, la production de la lectine PA-IL (**Wu et al., 2005**). Un mutant $\Delta oprF$ diminue également la virulence de *P. aeruginosa* sur deux modèles, les feuilles d'endives et *Caenorhabditis elegans*. Ce phénotype est lié à une diminution de la production de facteurs de virulence, tels que la pyocyanine, l'élastase B, la lectine PA-IL, l'exotoxine A ou encore les rhamnolipides, et par extension la mobilité de type « swarming », dû à un défaut de production de molécules du QS, notamment de PQS (**Bouffartigues et al., 2011; Chevalier et al., 2017; Fito-Boncompote et al., 2011**). Elle est de plus capable de jouer le rôle d'adhésine, puisqu'elle participe à l'adhésion sur cellules pulmonaires immortalisées A549, et peut se lier à la lectine PA-IIL (**Chevalier et al., 2017; Fito-Boncompote et al., 2011**).

Il a été montré qu'un biofilm cultivé en conditions anaérobies s'accompagnait d'une augmentation de la quantité d'OprF dans la membrane externe. Un mutant $\Delta oprF$ forme un biofilm très réduit dans ces conditions, et s'accompagne d'une abolition de l'activité nitrite réductase, faisant le lien avec l'incorporation putative des nitrites et nitrates via OprF

(Chevalier et al., 2017; Hassett et al., 2002; Yoon et al., 2002). Enfin, il a été montré qu'un mutant $\Delta oprF$ formait des agrégats en milieu LB liquide, un phénotype lié en partie à une augmentation de la quantité d'EPS Pel promouvant l'adhésion et du taux de c-di-GMP dans la cellule (Bouffartigues et al., 2015).

Il est également important de signaler que certaines porines peuvent être associées à des systèmes transporteurs (de type ABC, par exemple). Il existe également des canaux en feuillettes β pouvant être associés à des pompes d'efflux (de type RND, par exemple). Ces systèmes sont très importants dans le phénomène de résistance aux antibiotiques, car ils permettent l'expulsion de ces derniers à l'extérieur de la cellule.

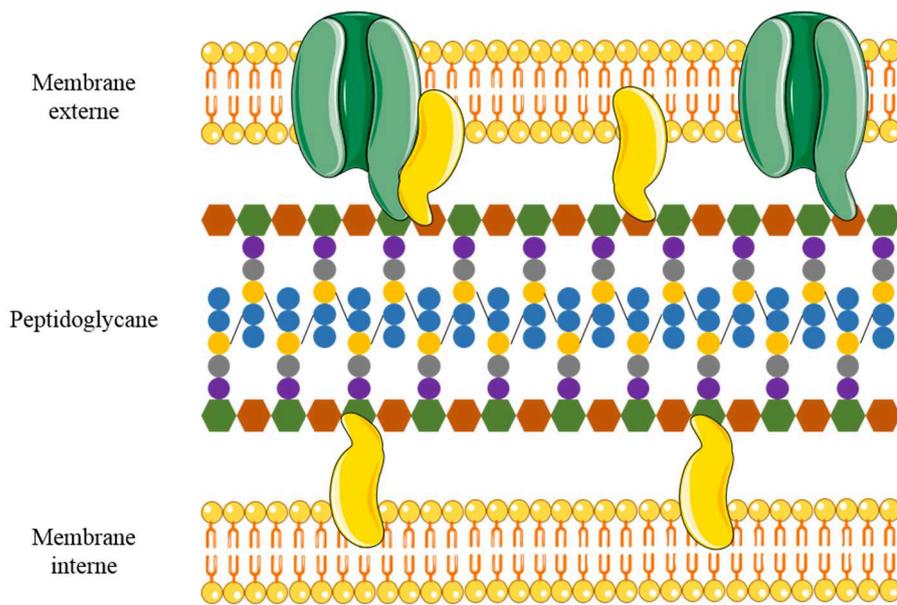
iii. Lipoprotéines

Le génome de *P. aeruginosa* code potentiellement 175 lipoprotéines. La majorité d'entre elles (77 %) est présente dans la membrane externe. La forme non mature de ces lipoprotéines est sécrétée et insérée dans la membrane interne via les voies de sécrétion Sec ou Tat. Ces lipoprotéines contiennent une « lipobox », une séquence signal consensus permettant la reconnaissance par l'enzyme Lgt, qui ajoute sur le résidu cystéine présent dans la « lipobox » un groupement diacylglycérol par une liaison thioéther. La séquence signal est ensuite clivée juste en amont du résidu cystéine par l'enzyme LspA. Enfin, une chaîne acyle est transférée sur le résidu cystéine par l'enzyme Lnt, formant la lipoprotéine mature. Dans le cas des lipoprotéines adressées à la membrane externe, le système LolABCDE permet leur prise en charge et leur transport du cytoplasme jusqu'à la membrane externe (Remans et al., 2010).

Parmi ces lipoprotéines, certaines ont été très bien caractérisées. Par exemple, le système Bam, composé de 4 lipoprotéines, est responsable de l'assemblage et de l'insertion des protéines dans la membrane externe (Hoang et al., 2011). OprI et OprL sont deux lipoprotéines importantes, contribuant à la stabilisation de la membrane externe via leur ancrage dans le peptidoglycane, et pouvant s'associer à OprF, comme décrit précédemment (Navare et al., 2015).

b. Périplasme

Cet espace, situé entre les deux membranes chez les bactéries à Gram négatif, est le siège du peptidoglycane. Peu d'études ont concerné cet espace chez *P. aeruginosa*, mais une étude protéomique globale a notamment permis de mettre en lumière les protéines composant cet espace (Imperi et al., 2009). La majorité des protéines identifiées dans cette étude était impliquée dans le transport, le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, et le bon repliement protéique (protéines chaperonnes). Il a été noté également que la fonction de près d'un tiers des



Légende		OprF		N-acétylglucosamine		L-alanine		Acide méso-2,6-diaminopimélique
		Lipoprotéine		N-acétylmuramique		D-isoglutamate		D-alanine

Figure 15. Représentation schématique de la structure du peptidoglycane.

Le peptidoglycane est un système d'ancrage de la membrane externe et interne chez *P. aeruginosa* : la membrane externe est accrochée sur le peptidoglycane via OprF et des lipoprotéines (Vollmer et al., 2008).

protéines identifiées restait inconnue, mettant en exergue le manque relatif de connaissances liées à ce compartiment (**Imperi et al., 2009**).

Le peptidoglycane confère la forme et la rigidité cellulaire à la bactérie, cette dernière étant renforcée par la liaison des lipoprotéines et protéines de membrane externe telles qu'OprF au peptidoglycane. Cette rigidité est importante pour empêcher la lyse de la bactérie lors de variations de la pression de turgescence. Le peptidoglycane est composé de longues chaînes de polysaccharides formées d'une succession de N-acétylglucosamine (NAG) et N-acétylmuramique (NAM), reliées entre elles par des pentapeptides situés sur les résidus NAM. Ce pentapeptide est composé, en règle générale chez les bactéries à Gram négatif, d'une L-alanine, un D-isoglutamate, un acide méso-2,6-diaminopimélique et de deux D-alanine. Ces pentapeptides sont également reliés entre eux par des liaisons covalentes pour former un réseau plus ou moins rigide (**Figure 15 ; Vollmer et al., 2008**).

c. Membrane interne

La membrane interne est une membrane symétrique, à la différence de la membrane externe. Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique, principalement composée de phospholipides dans laquelle s'insèrent de nombreuses lipoprotéines et protéines, assurant des fonctions aussi diverses que la respiration cellulaire, le transport de nutriments ou la signalisation cellulaire.

i. Phospholipides

Les phospholipides majoritaires de la membrane interne, ainsi que de la couche interne de la membrane externe du genre *Pseudomonas* sont les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylglycérols (PG) et les cardiolipines. Le squelette commun entre ces glycérophospholipides est le glycérol, sur lequel va se greffer deux chaînes d'AG et une tête polaire (éthanolamine dans le cas de la PE et glycérol dans le cas du PG). La cardiolipine est, elle, composée de deux moitiés d'acide phosphatidique reliées par un glycérol formant la tête polaire, et 4 chaînes d'AG (**Sohlenkamp et Geiger, 2016**). Cette composition, ainsi que la composition et la longueur des chaînes d'AG latérales greffées sur les glycérols est sujette à être adaptée en fonction des conditions environnementales, pour garantir une fluidité membranaire optimale de fonctionnement. Il est connu qu'un changement de température par exemple, affecte la composition des chaînes d'AG. En effet, le froid rigidifiant naturellement les membranes, la bactérie va s'adapter en diminuant la longueur et en désaturant les chaînes d'AG de ses phospholipides membranaires pour diminuer le point de fusion de ces AG et de

limiter cette rigidification (**Dubois-Brissonnet et al., 2000; Mansilla et al., 2004**). La voie de biosynthèse des AG est présentée en **Figure 16 (Boechat et al., 2013)**. L'enzyme ACC (Acétyl-CoA Carboxylase), formée par les deux sous-unités AccA et AccD, catalyse la première étape de la réaction de biosynthèse, pour former le malonyl-CoA. Ce produit sera transféré sur un transporteur de groupement acyl (Acyl Carrier Protein (ACP)) par FabD. La première réaction de condensation impliquant FabY ajoute une molécule d'acétyl-CoA sur le malonyl-ACP pour former le β -oxobutyryl-ACP. Ce dernier entre alors via FabG dans les cycles d'élongation des chaînes d'AG, impliquant les enzymes FabA/FabZ, FabI/FabV, FabB/FabF et une nouvelle molécule de malonyl-ACP, et FabG. La redondance observée au niveau du nombre d'enzymes pouvant catalyser chaque réaction témoigne de l'importance de cette voie de biosynthèse pour la bactérie. Néanmoins, quelques spécificités peuvent être notées. FabA peut par exemple, agir en tant qu'isomérase lorsque la chaîne possède 10 carbones, permettant d'outrepasser la prise en charge par FabI/FabV et continuer son élongation par FabB, permettant de créer alors une insaturation dans la chaîne d'AG. Il existe également d'autres moyens pour créer des insaturations dans la chaîne, via notamment les désaturases DesA et DesBC. Une autre voie permet la condensation de chaînes d'AG issues de la β -oxydation avec un malonyl-CoA via l'enzyme FabH3. La molécule résultante peut être intégrée dans le cycle d'élongation des chaînes d'AG via FabG (**Boechat et al., 2013**).

ii. Lipoprotéines

Il existe également des lipoprotéines ancrées dans la membrane interne, ce qui représente 23 % du nombre total de lipoprotéines. Si la biosynthèse est identique entre celles adressées à la membrane interne et celles adressées à la membrane externe, la différence réside dans le fait que celles de la membrane interne possèdent un signal de « non-prise en charge » par le système LolABCDE, et restent donc ancrées dans la membrane interne. Elles seraient impliquées dans des fonctions cellulaires telles que le métabolisme des carbohydrates, la respiration cellulaire, le système de sécrétion de type VI ou la division cellulaire (**Remans et al., 2010**).

2. Morphologie et division cellulaire

Comme mentionné en amont, le peptidoglycane confère la forme et la rigidité à la cellule. Cependant, il existe une multitude de morphologies cellulaires, et le peptidoglycane ne peut être le seul responsable de ces différentes formes. En 1987, Wachi et collaborateurs découvrent un cluster de gènes, *mre*, dont les produits sont responsables de la forme bacillaire d'*E. coli*. Lorsque ce cluster est muté, les cellules deviennent sphériques, et la complémentation de ce

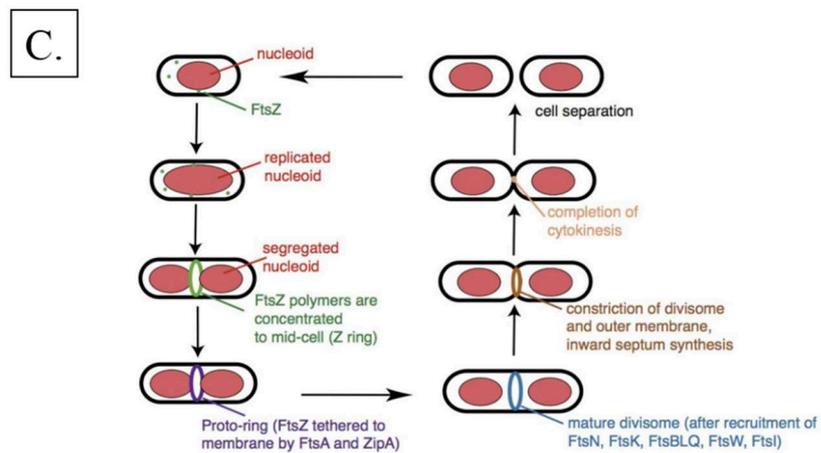
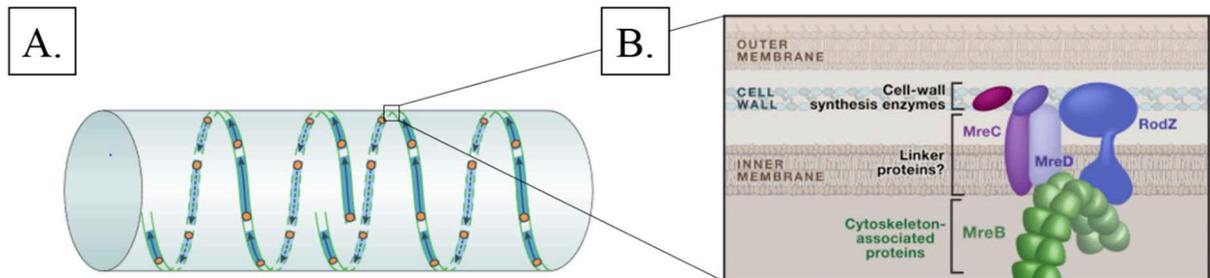


Figure 17. Morphologie et division cellulaire.

A. MreB se présente sous forme de longs filaments dynamiques (bords verts) se mouvant (flèches noires) autour de la cellule. Ce faisant, il permet la synthèse du peptidoglycane (rectangle bleu), étant relié via un complexe membranaire à des protéines de synthèse de ce peptidoglycane (point orange) (Errington, 2015). B. Représentation de l'attachement du filament de MreB au complexe membranaire, composé des protéines MreC, MreD et RodZ (Shi et al., 2018). C. Etapes et protéines impliquées dans la division cellulaire bactérienne (Haeusser et Margolin, 2016).

dernier restaure le phénotype sauvage, voire provoque un léger allongement des cellules (**Wachi et al., 1987**). En 1989, MreB est identifié par le même groupe comme étant le responsable de ces phénotypes observés. Ils montrent de plus qu'une surexpression de ce gène entraîne une filamentation de la cellule, ainsi qu'une inhibition de la division cellulaire (**Wachi et Matsubashi, 1989**). Le gène *mreB* est de plus absent du génome des coques, appuyant de fait l'hypothèse que ce gène est responsable de la forme bacillaire des bactéries (**Margolin, 2009**). Il est découvert en 2001 que MreB est l'homologue procaryote de l'actine (**Jones et al., 2001**). Cette protéine se polymérise dans le cytoplasme en longs filaments dynamiques tout autour de la cellule, qui interagissent avec la membrane interne de la cellule (**Figure 17A ; Errington, 2015**). Leurs déplacements au sein de la cellule coïncident avec la localisation spatiale de renouvellement du peptidoglycane (**Margolin, 2009**). En effet, les filaments de MreB interagissent avec un complexe protéique membranaire composé de MreC, MreD et RodZ, lui-même relié à des enzymes de synthèse du peptidoglycane, et l'ensemble se déplace tout autour de la cellule (**Figure 17B ; Shi et al., 2018**). MreB est donc impliqué dans le maintien de la forme cellulaire et du renouvellement du peptidoglycane.

FtsZ est l'acteur principal de la division cellulaire. D'abord, cette protéine se polymérise en un anneau contractile autour de la cellule (« anneau Z »), et se lie à la membrane interne via FtsA et ZipA, puis recrute différentes protéines pour former le divisome mature. La constriction peut alors débuter, et, au fur et à mesure de cette constriction, le nouveau peptidoglycane est synthétisé, la finalité étant la division cellulaire en deux cellules filles (**Figure 17C ; Haeusser et Margolin, 2016**). Cette division cellulaire est régulée de façon très complexe. Par exemple, le système MinC-MinD-MinE permet le placement correct de l'anneau contractile dans la cellule (**Lutkenhaus, 2007**). L'anneau contractile se forme une fois que le chromosome s'est dupliqué, et que les deux nucléoïdes formés aient migré aux extrémités de la cellule (**Margolin, 2005**). MreB pourrait être impliqué dans la ségrégation des chromosomes (**Kruse et al., 2003**). Cette protéine interagit directement avec FtsZ, et est nécessaire pour la division cellulaire (**Fenton et Gerdes, 2013**). Il semble également qu'un certain ratio entre MreB et FtsZ soit nécessaire pour le bon déroulement de ces processus fondamentaux. En effet, une surexpression de MreB ou une délétion de FtsZ aboutit à une filamentation cellulaire, par inhibition de la division, alors que les chromosomes sont correctement dupliqués. Il en résulte alors une longue cellule multi-nucléée (**Fenton et Gerdes, 2013; Margolin, 2009**). L'inverse résulte en une perte de la forme bacillaire, par simple division de cellules à la forme coccoïde (**Margolin, 2009; Wachi et al., 1987**).

Tableau 3. Exemples de stress d'enveloppe (adapté de Mitchell et Silhavy, 2019).

Catégorie	Stress	Effet sur l'enveloppe
Stress environnemental	Diminution de la température	Diminution du taux de biosynthèse Diminution du taux de repliement protéique Diminution de la fluidité membranaire
	Augmentation de la température	Non-repliement protéique Stress dans les voies de biogénèse Augmentation de la fluidité membranaire
	Changement de pH	Mauvais repliement protéique Perturbation/interruption des réactions
	Diminution de l'osmolarité	Assimilation d'eau Diminution de la concentration en solutés Diminution de la tension membranaire
	Stress redox	Dommages oxydatifs sur les protéines Dommages oxydatifs sur les membranes Mauvais repliement protéique
	Limitation en nutriments	Entrave à la biosynthèse
Antimicrobiens et composés toxiques	Métaux	Dommages oxydatifs Remplacement des métaux natifs
	Antibiotiques ciblant la membrane	Perturbation de la structure cible (peptidoglycane, par exemple)
	Antibiotiques inhibant l'élongation de la traduction protéique	Perturbation de la sécrétion via la machinerie de sécrétion protéique Sec
	Peptides antimicrobiens	Perturbation membranaire
	Sels biliaires	Perturbation membranaire
Stress intrinsèque	Stress traductionnel	Mauvais repliement protéique
	Surexpression protéique	Défaut de sécrétion Perturbation membranaire
	Mutations	Altération de la biogénèse

Enfin, il est courant qu'un stress induise une filamentation cellulaire. La réponse SOS est induite lorsque des dommages liés à l'ADN sont perçus par la cellule. RecA est alors induit, et va en retour cliver LexA, un répresseur des gènes liés à la réponse SOS, qui ne va donc plus pouvoir exercer sa répression. SulA est une protéine induite par cette réponse SOS, et se trouve être un répresseur de la division cellulaire par inhibition de la polymérisation de FtsZ, empêchant ainsi la transmission d'ADN endommagé aux cellules filles et ainsi de fausses informations génétiques. Cette filamentation induite par la réponse SOS est aussi utilisée par la bactérie à son avantage, notamment lors de l'infection. En effet, une longue cellule contenant plusieurs chromosomes augmente son taux de recombinaison génétique et donc son adaptation à son nouvel environnement, mais aussi permet d'échapper plus facilement aux cellules immunitaires comme les macrophages et les leucocytes polynucléaires neutrophiles, qui ne peuvent phagocyter de si longues cellules (Ultee et al., 2019).

3. Stress d'enveloppe

A la frontière avec l'environnement, l'enveloppe est une structure particulière et stratégique pour la cellule bactérienne. Même si elle peut survivre sans cette barrière au prix d'une adaptation drastique (Glover et al., 2009; Ultee et al., 2019), l'enveloppe est nécessaire pour une multitude de fonctions physiologiques, ainsi que la protection de la cellule face aux agressions environnementales. Le maintien de l'état physiologique des membranes comme du peptidoglycane est donc essentiel. Les stress affectant l'enveloppe (membranes externe et interne, et périplasme) sont multiples ; des exemples en sont présentés dans le **tableau 3** (Mitchell et Silhavy, 2019).

a. Stress chimique et biologique

Les antibiotiques sont des agents bien décrits pour provoquer des stress d'enveloppe. Les antibiotiques de la famille des β -lactamines vont se lier aux PLP (Protéines Liant les Pénicillines) qui sont en fait des enzymes nécessaires à la transpeptidation du peptidoglycane. Ces enzymes ont pour substrat naturel les dipeptides D-alanine-D-alanine présents dans les ponts peptidiques situés entre les chaînes de résidus NAM et NAG. Ces antibiotiques possèdent une analogie structurale avec ces dipeptides, permettant leur reconnaissance par les PLP. Cependant, ces antibiotiques vont établir une liaison covalente avec ces enzymes et ainsi inhiber leur fonctionnement (Fernandes et al., 2013). Un autre antibiotique ciblant la synthèse du peptidoglycane est la fosfomycine, ciblant l'enzyme responsable de la conversion du NAG en

NAM (**Michalopoulos et al., 2011**). Certains peptides antimicrobiens, les lantibiotiques, ciblent le lipide II, précurseur de la synthèse du peptidoglycane, et peuvent également former des pores dans la membrane (**Draper et al., 2015**). Enfin, la D-cyclosérine est un antibiotique ciblant l'enzyme responsable de la racémisation du L-alanine en D-alanine, l'alanine racémase (**Lambert et Neuhaus, 1972**). Ces antibiotiques vont provoquer une augmentation de protéines mal repliées dans le périplasme, ainsi qu'une perte d'intégrité de l'enveloppe.

Les peptides antimicrobiens cycliques cationiques ribosomiaux et non ribosomiaux (famille des polymyxines), sont des molécules ciblant la membrane externe. Généralement, ils vont se lier au LPS par interaction électrostatique, en lieu et place des cations divalents présents naturellement présents (Mg^{2+} ou Ca^{2+}). L'encombrement stérique de ces peptides, bien supérieur aux cations divalents, perturbe l'organisation de la membrane par formation de pores ou en augmentant la perméabilité membranaire (**Falagas et al., 2005; Zhang et Gallo, 2016**).

Enfin, les aminoglycosides sont des antibiotiques ciblant les ribosomes, et donc la synthèse protéique. Bien que la cible de cette famille d'antibiotiques ne soit pas directement les membranes ou le peptidoglycane, leur mode d'action conduit à un stress d'enveloppe. En effet, la traduction protéique étant perturbée, elle conduit à la synthèse de protéines défectueuses, mal repliées, pouvant conduire au déclenchement d'un stress d'enveloppe lors de l'incorporation de ces protéines dans les membranes. De plus, ces antibiotiques sont fortement cationiques, et, comme les peptides antimicrobiens, peuvent interagir avec les LPS de la membrane externe, la perturbant et la déstabilisant (**Kotra et al., 2000; Krause et al., 2016**).

La présence de métaux, de solvants, de détergents ou les conditions oxydo-réductrices et de pH du milieu peuvent entraîner des dommages oxydatifs sur les lipides, les solubiliser et entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire (**Rowley et al., 2006**).

b. Stress mécanique

i. Température

Chaque bactérie possède une température optimale de croissance, sa physiologie étant adaptée à cette température. Lorsque la température décroît brusquement, les membranes deviennent plus rigides, impactant alors les échanges avec l'environnement, et provoque un ralentissement global du métabolisme bactérien, menant à un arrêt de la synthèse protéique, une agrégation des protéines entre elles (dus à une activité diminuée des protéines chaperonnes) et un arrêt de la réplication de l'ADN (**Keto-Timonen et al., 2016**).

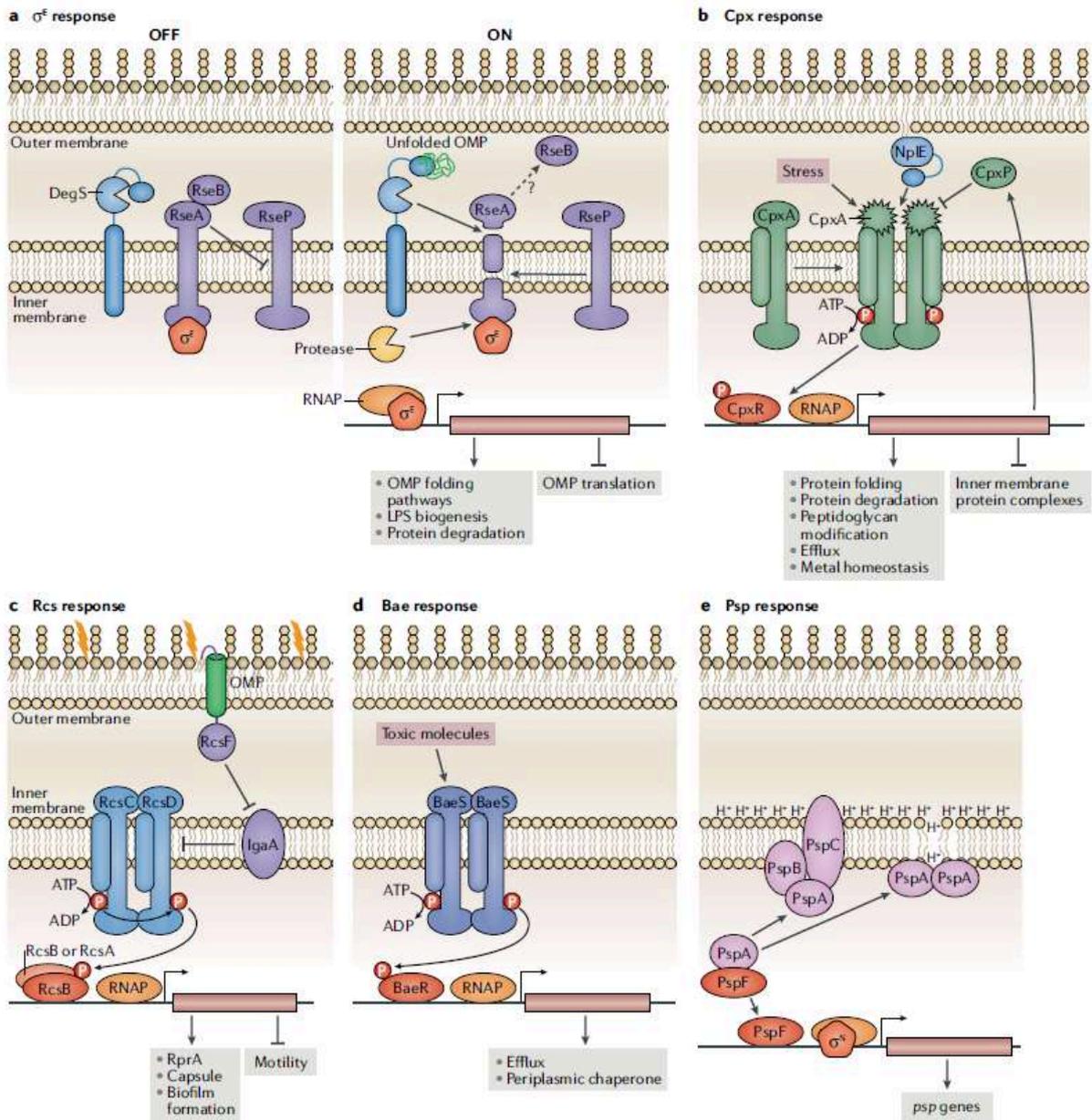


Figure 18. Systèmes de réponse au stress d'enveloppe chez *E. coli*.

A. En absence de stress, le facteur sigma ECF RpoE est séquestré par son facteur anti-sigma RseA, lié à RseB. Lors d'un stress, DegS se lie à des protéines non repliées, et permet de cliver RseA, à l'aide de RseP, libérant RpoE pouvant réguler les gènes de son régulon. Les systèmes à deux composants Cpx (B), Rcs (C) et Bae (D) sont également impliqués. Le système à deux composants Rcs est plus complexe, la réponse se faisant par un phosphorelais (voir texte). E. La réponse Psp implique quant à elle PspF, qui régule les gènes sous sa dépendance lorsque PspA le libère (Mitchell et Silhavy, 2019).

A l'inverse, une brusque augmentation de la température provoque une déstabilisation des membranes via une augmentation de la fluidité et de la perméabilité membranaire. De plus, les chocs chauds provoquent une accumulation de protéines mal repliées et donc des agrégats protéiques (Schumann, 2017; Yura et al., 1993).

ii. Osmolarité

Un brusque changement d'osmolarité de l'environnement peut engendrer de lourdes conséquences pour la cellule. Un choc hyperosmotique provoque une déshydratation par sortie massive d'eau de la cellule, ainsi que la plasmolyse du cytoplasme, entraînant un décollement de la membrane cytoplasmique. A l'inverse, un choc hypo-osmotique engendre une augmentation de la pression de turgescence sur l'enveloppe cellulaire, par entrée massive d'eau dans la cellule. Si le peptidoglycane permet à la bactérie de résister à cette pression mécanique, d'autres systèmes doivent entrer en jeu lors de chocs trop importants, comme le relargage de solutés (glycine-bétaïne, proline, ions K^+ ...) afin d'éviter la lyse cellulaire (Rojas et Huang, 2018; Wood, 2015).

4. Réponse aux stress d'enveloppe

Pour répondre aux stress d'enveloppe, les bactéries ont développé tout un arsenal moléculaire. La réponse au stress d'enveloppe est très bien décrite chez *E. coli*, et elle implique les systèmes Cpx, Rcs, Bae et Psp, ainsi que le facteur σ ECF RpoE et 6 canaux mécanosensibles (**Figure 18**). Chaque système répond à des stress particuliers, bien qu'un type de stress puisse activer plusieurs voies de réponse. Les systèmes Cpx et Bae sont des TCS simples, avec un senseur (CpxA et BaeS, respectivement) et un régulateur (CpxR et BaeR, respectivement). Le système Rcs est aussi un TCS, mais plus complexe, impliquant le senseur de stress RcsF, une lipoprotéine de la membrane externe, IgaA, une protéine de membrane interne inhibant soit RcsC soit RcsD dans des conditions normales. En conditions de stress, RcsF se lie à IgaA, inhibant son action de répression. RcsC peut alors s'autophosphoryler, puis transmettre son phosphate à RcsD, qui va à son tour phosphoryler RcsB, le régulateur de réponse. La voie Psp est un système permettant le maintien de la force proton-motrice. Lorsque cette dernière est affectée, PspB et PspC se lie à PspA, libérant ainsi PspF, qui est un activateur de transcription se liant uniquement à RpoN, lorsque celui-ci est accroché au core polymérase. Enfin, RpoE, le facteur σ ECF, est activé lorsque DegS se lie à des protéines mal repliées, qui va s'activer et protéolyser RseA, le facteur anti- σ de RpoE, le libérant afin qu'il aille réguler les gènes sous sa

dépendance. De plus, cette bactérie possède plusieurs canaux mécanosensibles la protégeant des chocs osmotiques : MscL et 5 de la famille des MscS.

Ces systèmes vont pouvoir réguler des fonctions physiologiques tels que la biogénèse du LPS, les chaperonnes, les protéines impliquées dans la dégradation des protéines, la modification du peptidoglycane, les systèmes d'efflux, la mobilité, la formation de biofilm ou encore des ARNnc pouvant inhiber la traduction des protéines de membrane externe, par exemple (**Figure 18 ; Mitchell et Silhavy, 2019**).

Chez *P. aeruginosa*, la réponse aux stress d'enveloppe implique 3 facteurs σ ECF, 12 TCS et 9 canaux mécanosensibles. Les TCS répondent notamment à des stress impliquant des métaux lourds, des antibiotiques et des peptides anti-microbiens. Les facteurs σ ECF incluent principalement AlgU (l'homologue de RpoE) et SigX. Ces deux facteurs σ ECF possèdent un régulon d'environ 300 gènes et contrôle des phénotypes majeurs au niveau de la virulence et du biofilm. SbrI a récemment été décrit et classé dans cette catégorie, bien que son régulon reste relativement étroit, avec environ 20 gènes (**McGuffie et al., 2016**). Enfin, cette bactérie possède, en plus de MscL, 8 canaux mécanosensibles appartenant à la famille des MscS, suggérant une régulation fine lors de stress hypo-osmotiques, et / ou des rôles particuliers au sein de la cellule.

a. Facteurs sigma à fonction extra-cytoplasmique

Les facteurs σ sont des sous-unités transitoires de l'ARN polymérase, responsables de l'initiation de la transcription des gènes. Les facteurs σ sont divisés en deux familles, les facteurs σ^{70} et σ^{54} , différents structurellement et fonctionnellement entre eux (**Llamas et al., 2014**). En effet, le mode d'initiation de la transcription des facteurs σ^{54} est plus proche de celui des eucaryotes que des procaryotes. Le représentant majeur de cette dernière est le facteur σ^N (RpoN) (**Merrick, 1993**). La famille des facteurs σ^{70} est divisée en quatre groupes. Le premier groupe réunit les facteurs σ primaires essentiels pour la bactérie et hautement conservés entre eux, tels que σ^D (RpoD). Le deuxième est très similaire au premier, excepté qu'il réunit des facteurs σ non-essentiels pour la bactérie, tel que σ^S (RpoS). Le troisième regroupe des facteurs σ alternatifs, spécifiques de certaines fonctions physiologiques comme la synthèse du flagelle (σ^F ou RpoF) ou la réponse au stress thermique (σ^H ou RpoH), et possède donc des régulons ciblés. Le dernier groupe de cette famille, le plus large et le plus diversifié, est celui des facteurs σ ECF, qui sont activés en réponse à des stimuli environnementaux (extra-cytoplasmiques) jouant donc un rôle de transduction de signaux (**Llamas et al., 2014**). Ils ont été découverts il

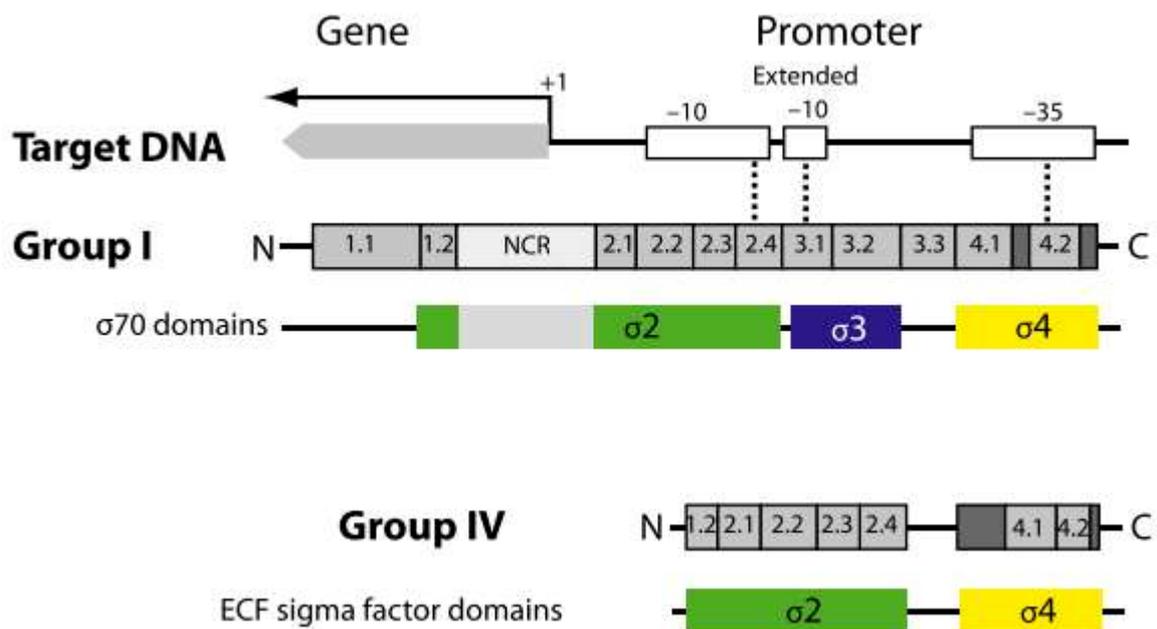


Figure 19. Structure des facteurs sigma des groupes I et IV (ECF).

Les domaines $\sigma 2$ et $\sigma 4$, conservés chez les ECF, sont nécessaires pour la reconnaissance des boîtes -10 et -35 des promoteurs (Llamas et al., 2014).

y a 25 ans par Lonetto et collaborateurs, en analysant la structure de facteurs σ (Lonetto et al., 1994). En effet, si les facteurs σ du premier groupe sont caractérisés structurellement par la présence de 4 domaines, ces facteurs σ ECF ne sont composés que des domaines σ_2 et σ_4 , à savoir les deux domaines nécessaires pour la reconnaissance des séquences -10 et -35 des promoteurs (Figure 19 ; Llamas et al., 2014). Une étude phylogénétique réalisée sur 2708 ECF a révélé que 1735 ECF pouvaient être subdivisés en 43 groupes majeurs (contenant plus de 10 ECF), et 128 ECF en 24 groupes mineurs (Staroń et al., 2009).

En absence de stimuli, les ECF sont inactifs, séquestrés par des facteurs anti- σ , associés à la membrane interne pour la plupart. Lors de la perception d'un stimulus, ce facteur anti- σ est dégradé par des protéases intra-membranaires et cytoplasmiques, conduisant à la libération du facteur σ qui ira réguler les gènes sous sa dépendance (Helmann, 2002).

*i. Facteurs σ ECF chez *P. aeruginosa**

Chez *P. aeruginosa* PAO1, il existe 24 facteurs σ , dont 19 à fonction extra-cytoplasmique, *P. aeruginosa* PA14 possédant un facteur σ ECF supplémentaire. Ce nombre considérable est lié à ses extraordinaires facultés d'adaptation à tous types d'environnements. Ces ECF sont impliqués dans l'incorporation du fer, de métaux ou encore dans la réponse au stress d'enveloppe et sont décrits dans une revue à laquelle j'ai contribué (Chevalier et al., 2018).



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Gene Regulatory Mechanisms

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagrmExtracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*[☆]

Sylvie Chevalier^{a,*}, Emeline Bouffartigues^a, Alexis Bazire^b, Ali Tahrioui^a, Rachel Duchesne^a, Damien Tortuel^a, Olivier Maillot^a, Thomas Clamens^a, Nicole Orange^a, Marc G.J. Feuilloley^a, Olivier Lesouhaitier^a, Alain Dufour^b, Pierre Cornelis^a

^aLaboratory of Microbiology Signals and Microenvironment LMSM EA 4312, Normandy University, University of Rouen, 27000 Evreux, France

^bIUEM, Université de Bretagne-Sud (UBL), Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines EA 3884, Lorient, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa
ECF σ
Iron uptake
Virulence
Cell wall stress response
Biofilm formation

ABSTRACT

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, like all members of the genus *Pseudomonas*, has the capacity to thrive in very different environments, ranging from water, plant roots, to animals, including humans to whom it can cause severe infections. This remarkable adaptability is reflected in the number of transcriptional regulators, including sigma factors in this bacterium. Among those, the 19 to 21 extracytoplasmic sigma factors (ECF σ) are endowed with different regulons and functions, including the iron starvation σ (PvdS, FpvI, HasI, FecI, FecI2 and others), the cell wall stress ECF σ AlgU, SigX and SbrI, and the unorthodox σ^{Vrel} involved in the expression of virulence. Recently published data show that these ECF σ have separate regulons although presenting some cross-talk. We will present evidence that these different ECF σ are involved in the expression of different phenotypes, ranging from cell-wall stress response, production of extracellular polysaccharides, formation of biofilms, to iron acquisition.

1. Introduction

The Gram-negative γ -proteobacterium *Pseudomonas aeruginosa* is the most prominent and best-studied member of the genus *Pseudomonas* and is known for its capability to colonize a wide variety of niches from diverse marine to terrestrial habitats and for its large metabolic capacity [1]. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen with a broad host range from amoeba to humans [2], which can cause acute or chronic infections, in immune-compromised and cystic fibrosis patients [3]. Its high antibiotic resistance levels towards a broad spectrum of antimicrobials represent a serious threat for individual and public health [4]. Additionally, *P. aeruginosa* forms biofilms and undergoes phenotypic diversification to small colony variants or conversion to a mucoid phenotype which further complicates antibiotic therapies [5,6]. In 2000, the complete sequence of the *P. aeruginosa* strain PAO1 genome was published [7], revealing a large genome of 6.3 million base pairs with 5570 predicted open reading frames (ORFs), including a strikingly high proportions of ORFs encoding regulatory two-component systems (TCS) (2.1%) and transcriptional regulators (7.2%). These regulators have been hypothesized to provide the regulatory framework for the remarkable environmental adaptability of *P. aeruginosa* [8]. Together with TCSs and quorum sensing systems, alternative sigma factors are

among the most important and common regulatory mechanisms of *Pseudomonas* [9].

Sigma factors are multi-domain subunits of bacterial RNA polymerase (RNAP) that play critical roles in transcription initiation, including the recognition and opening of promoters as well as the initial steps in RNA synthesis. While the primary sigma factor σ^{70} ensures the bulk of transcription during growth, a major strategy used by bacteria to regulate gene expression consists of modifying the RNAP promoter specificity by means of alternative sigma factors. Among them, Extra Cytoplasmic Function sigma factors (ECF σ) constitute the most abundant group that was identified based on their homology with the primary sigma factor σ^{70} [10]. A comprehensive classification of more than 2700 ECF σ from hundreds of bacterial genomes has defined 43 major groups and numerous minor phylogenetically distinct subgroups [11]. On average, bacterial genomes harbour approximately six ECF σ that represent a widespread principle of bacterial signaling by connecting the perception of an extracellular stimulus to the induction of specific gene sets [11,12]. ECF σ are in most cases sequestered and kept inactive by specific anti-sigma factors that respond to environmental stimuli. Upon environmental stresses or specific inducing factors, signaling networks result in the release of the ECF σ , which then recruit the RNAP catalytic core and trigger gene expression of dedicated target

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Dynamic gene expression, edited by Prof. Patrick Viollier.

* Corresponding author at: Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, LMSM EA 4312, University of Rouen Normandy, Centre of Sanitary Safety of Normandy (CSSN), Normandy University, 55, rue St Germain, 27000 Evreux, France.

E-mail address: sylvie.chevalier@univ-rouen.fr (S. Chevalier).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008>

Received 4 January 2018; Received in revised form 6 March 2018; Accepted 30 April 2018
1874-9399/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

regulons. Over the past decade, the process called regulated intramembrane proteolysis (RIP) has emerged as a paradigm for transmembrane signal transduction in bacteria. One of the best-characterized examples of such signal transduction is the pathway governing the σ^E -dependent cell envelope stress response in *Escherichia coli*. In unstressed cells, σ^E is sequestered at the membrane by the transmembrane anti- σ factor RseA. Stresses that compromise the cell envelope activate the RIP proteolytic pathway. Under this condition, unfolded outer membrane proteins (OMPs) in the periplasm bind to the inner membrane protease DegS that removes the periplasmic domain of RseA creating a substrate for the next protease in the pathway, RseP, which then cleaves RseA. The remaining fragment of RseA is released into the cytoplasm and fully degraded by the ATP-dependent protease ClpXP, thereby freeing σ^E to reprogram gene expression. A growing body of evidence indicates that RIP is used to regulate similar anti- σ factor/ σ factor pairs throughout the bacterial world and has been adapted to recognize a wide variety of signals and control systems as diverse as envelope stress responses, virulence and iron-siderophore uptake [13].

Most of ECF σ display a characteristic protein domain architecture with only two of the four regions of σ^{70} proteins remaining, namely regions σ_2 and σ_4 [14], which are sufficient for binding to the RNAP core enzyme and promoter recognition [11,14]. Their cognate anti- σ factor is often membrane-anchored and encoded by an operon including the corresponding ECF σ gene. ECF σ generally cause expression of relatively few genes, and most ECF σ are subject to positive auto-regulation, thereby enhancing their activating effect for as long as inducing conditions prevail. Once the stimulus ceases, the simultaneous up-regulation of the co-expressed anti- σ then ensures a swift shut-off of σ factor activity. *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 display 19 and 21 ECF σ factors, respectively (FecI2 and PA14_28970 being specific for PA14), reflecting thus their huge adaptation abilities (Table 1). The functions controlled by *Pseudomonas* ECF σ include cell envelope stress response, production of the exopolysaccharide alginate, iron uptake via ferric-siderophores, heme and iron-citrate, and pathogenicity [15]. In *P.*

aeruginosa PAO1, 14 ECF σ belong to the iron-starvation group, based on their role in the regulation of iron uptake [15,16]; three others belong to the cell wall stress response group, one is associated to phosphate starvation and one is so far unknown (Table 1, Fig. 1). In addition to giving the latest highlights in terms of function and regulon of all ECF σ of *P. aeruginosa*, this review focuses on the regulation of their expression and activity.

2. Cell wall stress response ECF σ

The bacterial cellular envelope is a target for numerous antibiotics and host immune defences. Envelope biogenesis must be monitored to establish and maintain a contiguous barrier. The envelope must also be repaired and modified in response to environmental assaults. Cell wall stress responses sense envelope damages or defects and encompass all regulatory events to mitigate stress, enabling a cell to maintain its envelope integrity. Many Gram-negative cell wall stress responses, which must contend with an outer membrane and a dense periplasm containing the peptidoglycan layer, have been associated with the status of protein folding and homeostasis of membranes and peptidoglycan, as it is the case for *E. coli* RpoE ECF σ (σ^E) [17]. In *P. aeruginosa*, AlgU, SigX and SbrI are the three ECF σ involved in maintaining cell envelope integrity.

2.1. AlgU: mucoidy, stress response and beyond

2.1.1. AlgU and its anti- σ factor MucA

The human genetic disease cystic fibrosis favors lung infection by bacterial pathogens including *P. aeruginosa* [18]. Patients are initially intermittently colonized by *P. aeruginosa* strains resembling environmental strains (non-mucoid). Over time, colonizing *P. aeruginosa* strains switch to a mucoid phenotype characterized by an over-production of the exopolysaccharide alginate [18–20], leading to the establishment of chronic infection and concomitant airway inflammation, which is the

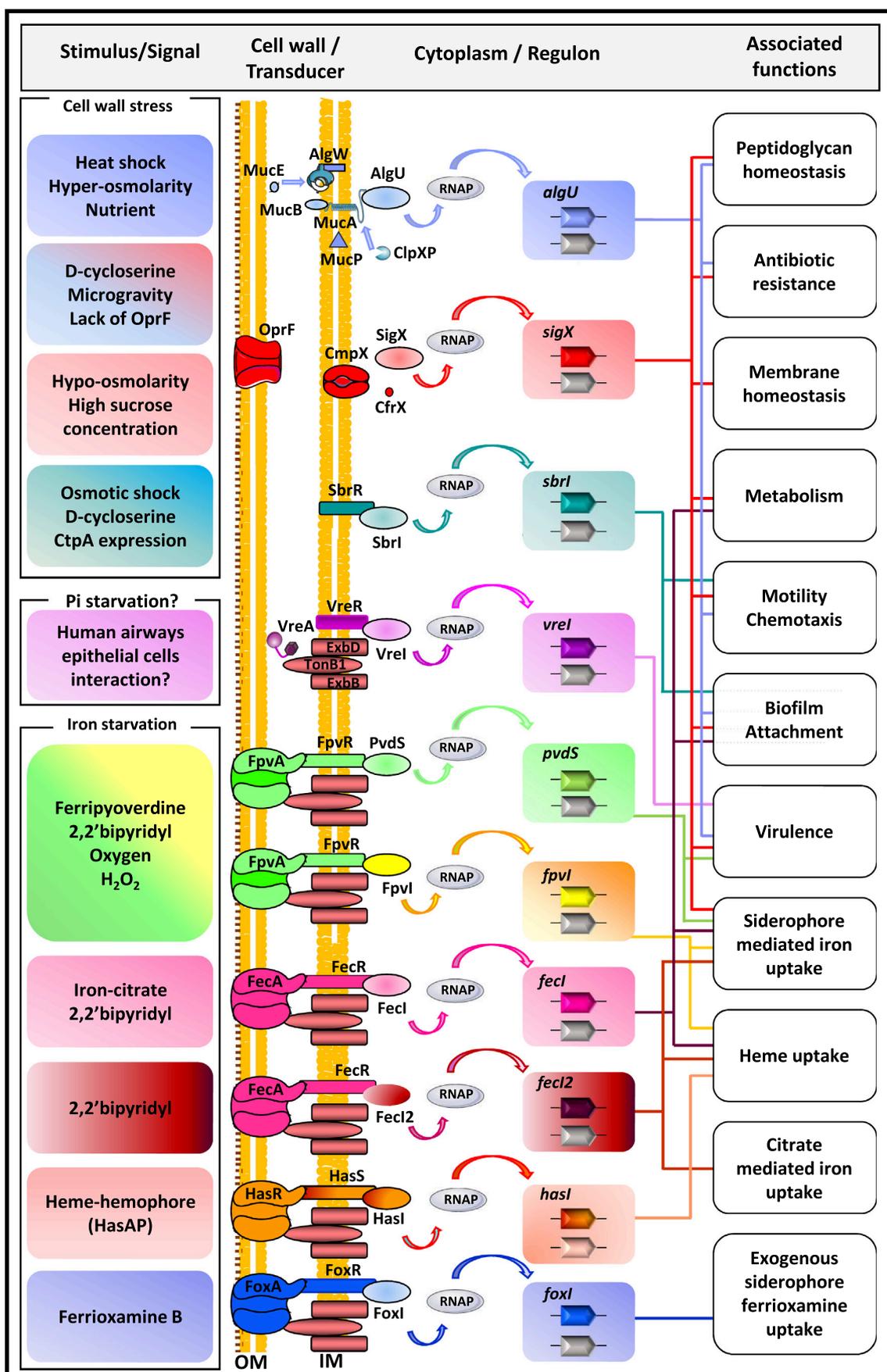
Table 1
ECF σ factors in *P. aeruginosa* PAO1 and PA14.

PAO1 n°	PA14 n°	Name	Length (AA)	Regulatory elements	
				Anti- σ	TBDT
ECF sigma factors					
<i>Iron responsive ECFσ</i>					
PA0149	PA14_01840	–	181	PA0150	PA0151
PA0472	PA14_06180	FiuI	172	PA0471 (FiuR)	PA0470 (FiuA)
PA1300	PA14_47400	–	175	PA1301	PA1302
PA1363	PA14_46660	–	174	PA1364	PA1365
PA1912	PA14_39800	FemI	168	PA1911 (FemR)	PA1910 FemA
PA2050	PA14_37990	–	168	PA2051	PA2057, PA2070
PA2093	PA14_37430	–	169	PA2094	PA2089, PA2590
PA2387	PA14_33800	FpvI	159	PA2388 (FpvR)	PA2398 (FpvA)
PA2426	PA14_33260	PvdS	187	PA2388 (FpvR)	PA2398 (FpvA)
PA2468	PA14_32710	FoxI	172	PA2467 (FoxR)	PA2466 (FoxA)
PA3285	PA14_21550	–	203	–	–
PA3410	PA14_19990	HasI	171	PA3409 (HasS)	PA3408 (HasR)
PA3899	PA14_13460	FecI	169	PA3900 (FecR)	PA3901 (FecA)
PA4896	PA14_64700	–	178	PA4895	PA4897
^a	PA14_27690	FecI2	197	PA14_06170	PA14_06180
<i>Virulence?</i>					
PA0675	PA14_55550	VreI	181	PA0676 (VreR)	PA0674 (VreA?)
<i>Cell wall stress response ECFσ</i>					
PA0762	PA14_54430	AlgU	193	PA0763 (MucA)	
PA1776	PA14_41575	SigX	165	PA1776 (CfrX?)	
PA2896	PA14_26600	SbrI	194	PA2895 (SbrR)	
<i>Unknown</i>					
^b PA1351	PA14_46810	–	407	–	–
^a	PA14_28970	–	179	PA14_28980	

TBDT: TonB-dependent transporter.

^a PA14_27690 and PA14_28970 are PA14 specific ECF σ .

^b PA1351 is larger than the other ones.



(caption on next page)

Fig. 1. Physiological functions and mechanisms of activation of some ECF σ in response to known or suspected signals in *P. aeruginosa*.

The signals are depicted in the left column: cell wall stress for AlgU, SigX and SbrI; Pi (inorganic phosphate restriction) for VreI, and iron starvation for PvdS, FpvI, FecI, FecII, HasI and FoxI. The outer membrane is represented and shows the proteins demonstrated or thought to be involved in the transduction of the signal (OprF for SigX; TBDTs for the iron starvation ECF σ). The cytoplasmic membrane is also shown with the respective anti- σ factors. The regulons and the associated functions are depicted in the column on the right. The main functions of the different ECF σ are described in the text.

main cause of mortality for CF patients [18–20]. The alginate biosynthesis genes constitute the 12-gene *algD* operon [20–22]. The amount of alginate produced depends on the transcription level of this operon and therefore on the activity of the single promoter lying upstream of *algD*. The *algU* gene, which does not belong to the *algD* operon, was identified as necessary for *algD* transcription and the mucoid phenotype [23]. AlgU (also known as AlgT, σ^{22} and σ^E) was confirmed to be a σ factor since it associates to RNAP and directs transcription of target promoters [24,25].

AlgU is a 22.2 kDa protein and its gene is highly conserved in all sequenced *P. aeruginosa* genomes [26]. AlgU is closely related (66% identity) to the ECF σ σ^E (RpoE) of *E. coli* [27]. The consensus promoter sequences recognized by AlgU were reported to be GAACCT-N16/17-TCtGA (highly conserved nucleotides in capital letters) [28,29]. A *de novo* sequence logo was generated for AlgU-dependent promoters, which can be summed up as: **G(A/G)A(A/C)(C/T)TT** – N₁₄ – **GGTC NNA** (nucleotides in bold matching the above sequences) [30]. AlgU is inhibited by the anti- σ factor MucA [31,32]. The *mucA* gene lies downstream of *algU*, these two genes being part of the *algU-mucABCD* operon [33]. MucA is a 21.0 kDa (194 residues) protein located in the cytoplasmic membrane. A single transmembrane segment (residues 84–103) separates its cytoplasmic N-terminal and its periplasmic C-terminal domains [34]. MucA cytoplasmic domain binds AlgU, preventing the association of the σ factor with the core RNAP and the transcription of AlgU-dependent genes. Although structural data on AlgU, MucA, and the AlgU-MucA complex are missing, the results obtained with *E. coli* σ^E and its anti- σ RseA provide some clues: when σ^E is bound to the cytoplasmic domain of RseA, the latter is sandwiched between the σ_2 and σ_4 domains of σ^E [35]. The binding of σ^E to RseA and RNAP are mutually exclusive and σ^E binds more tightly *in vitro* to RseA than to RNAP [35]. The MucB protein, encoded by the third gene of the *algU* operon, is also a negative regulator of AlgU activity [36]. MucB is located into the periplasm [34] where it binds to the C-terminal domain of MucA thereby preventing the cleavage of MucA by the periplasmic AlgW protease [37]. By increasing the stability of MucA, MucB favors the sequestration of AlgU by MucA and contributes to maintaining AlgU in an inactive state (Fig. 2).

2.1.2. AlgU activation mechanisms

In most cells displaying a permanent mucoid phenotype, alginate over-production results from AlgU hyper-activity, which provokes a very high transcription level of the *algD* operon. Besides being AlgU-dependent, the *algD* promoter is the target of numerous regulators [22,38], including AlgR which gene is AlgU-dependent [39]. The most frequent mechanism of conversion to mucoidy is the occurrence of spontaneous mutations in the *mucA* gene leading to truncated MucA proteins [40]. Such mutations were observed in 82–93% of mucoid isolates in three studies [41–43], and in 38–44% of mucoid isolates in two other reports [44,45]. A number of different *mucA* mutations have been reported [41–45], the most frequent being the deletion of a G from a string of five G residues at positions 426–430 in *mucA* (this mutation was named *mucA22* [39], Δ G430 [43–45] or Δ G440 [40–42]). Most of the mutations occur within the third quarter of the *mucA* sequence [41], which leads to MucA proteins with a truncated C-terminal periplasmic domain. While neither their membrane location nor their ability to sequester AlgU should be impaired, they are unable to bind the periplasmic MucB protein. MucA mutants are generally less stable than wild-type MucA [46], which unbalances the MucA/AlgU ratio and leaves free a part of AlgU copies. Furthermore, three of the five

promoters controlling the *algU* gene are AlgU-dependent [47]. This positive auto-regulatory loop leads to higher production of AlgU when the latter is active [46]. The instability of MucA mutants is due to their degradation by the periplasmic protease Prc [48], while Prc does not seem to play a major role on wild-type MucA proteolysis [48,49]. Other proteases such as MucP in the inner membrane and ClpXP in the cytoplasm were hypothesized to further degrade MucA mutants to achieve the AlgU release, but this remains to investigate [49]. Finally, mucoid *mucA* mutants can revert *in vivo* and *in vitro* to a non-mucoid phenotype *via* secondary-site mutations in *algU* or in other unidentified genes [27,33,43].

Soon after its discovery, AlgU was shown to play a role in stress response [28]. This suggested that in addition to be permanently hyperactive in mucoid cells, AlgU could be transiently activated in non-mucoid cells in response to stresses. Antibiotics that block peptidoglycan synthesis indeed induce AlgU activity [50], by RIP, a mechanism that relies on the proteolysis of MucA (RIP) [37,50–53], and is similar to the pathway activating σ^E in *E. coli* [13]. *P. aeruginosa* RIP is depicted in Fig. 2 and will only be summed up below since it was reviewed in detail [15,49]. Stresses leading to dysfunction in outer-membrane assembly, structure and/or secretion systems activate RIP through molecular signals such as peptide sequences from proteins accumulated in the periplasm (over-produced envelope protein MucE, unassembled OMPs, over-produced CupB5, truncated type IV pilin) and unassembled lipopolysaccharides [49–51]. Periplasmic accumulation of these proteins activates the periplasmic protease AlgW which cleaves MucA within its periplasmic domain [51]. As mentioned above, MucB binds MucA and protects MucA from proteolysis by AlgW [37,53], but this can be antagonized by the binding of unassembled periplasmic lipopolysaccharides onto MucB [54]. After AlgW action, MucA is subjected to further proteolysis by MucP (also known as YaeL) and ClpXP, which are in the inner membrane and the cytoplasm, respectively [37,49,52]. The *algU-mucABCD* operon encodes two other regulators: whereas the MucC action remains unclear [49,55], MucD is a protease which represses RIP, presumably by degrading and/or chaperoning misfolded or accumulated proteins in the periplasm, thereby preventing or limiting AlgW activation [49,51].

2.1.3. AlgU regulon and relationships with other regulators

The AlgU regulon has been mainly investigated by comparing mucoid cells (*mucA* mutants) to their non-mucoid counterpart or to their isogenic *algU* mutant [29,56,57] or by stressing cells with the peptidoglycan synthesis inhibitor D-cycloserine and comparing to unstressed bacteria [37,50]. As expected, the regulon included the *algU* and *algD* operons, the alginate regulatory genes, stress response genes, genes encoding membrane proteins and proteins involved in lipopolysaccharide synthesis (Table S1). In mucoid cells, a strong induction of nine genes encoding lipoproteins was furthermore observed [29,57]. These lipoproteins are pro-inflammatory toxins, and seven of these genes could be directly AlgU-dependent [57]. The involvement of AlgU in the pathogenesis of *P. aeruginosa* was also supported by the induction of virulence-related genes in mucoid cells as *lasB* and *aprA* encoding the major protease elastase and the alkaline metalloproteinase, respectively, and *hcn* genes encoding hydrogen cyanide synthases [56], or the secondary metabolite paerucumarin biosynthesis genes *pvcAB* [37,50,58]. Identifying the AlgU regulon members within the larger D-cycloserine regulon by a subtractive approach applied on several transcriptomic datasets led to a total list of 293 genes [37]. Genes identified in transcriptomic experiments could be either under direct

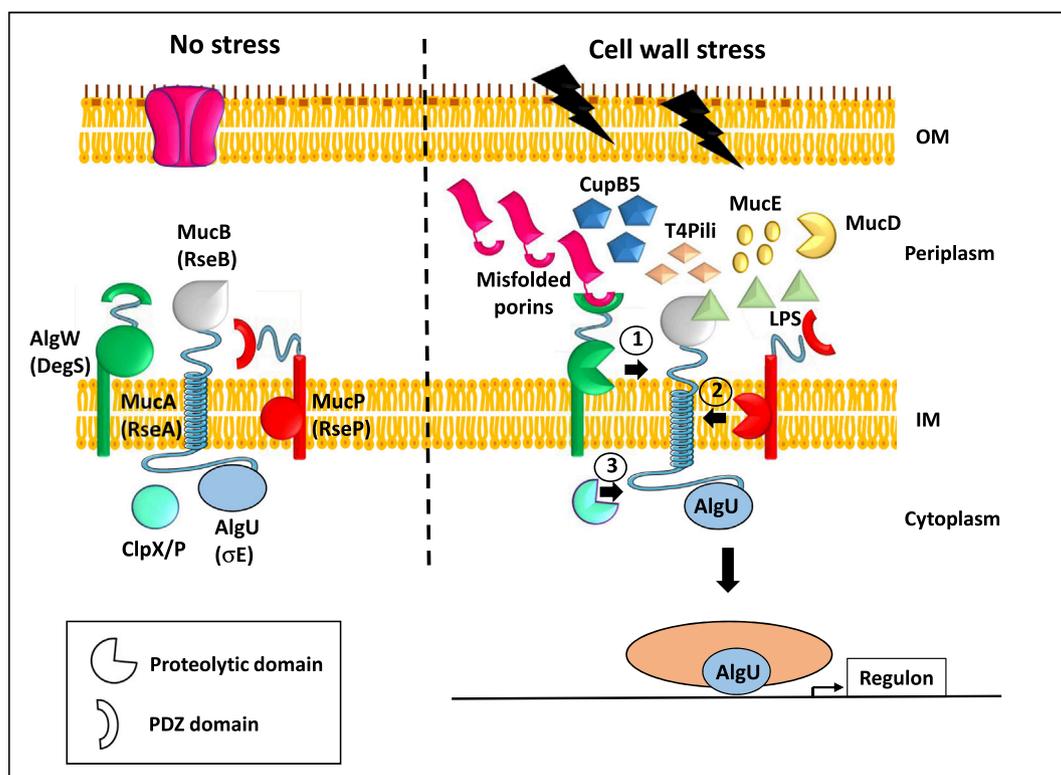


Fig. 2. Mechanism of AlgU activation.

The mechanism activating AlgU in response to stresses is based on a process named regulated intramembrane proteolysis (RIP), a pathway that has been first depicted for activating σ^E in *E. coli* [13]. The names of the proteins that are involved in RIP in *P. aeruginosa* and *E. coli* (parenthesis) are indicated. The left panel depicts the unstressed situation with correctly folded OMPs (top). Under this condition, AlgU is sequestered in the cytosol by the MucA (RseA) anti- σ factor. The right panel shows the situation when the cell undergoes a cell wall stress, which results in the accumulation of over-produced envelope protein MucE, unassembled OMPs, over-produced CupB5, truncated type IV pilin, and unassembled LPS in the periplasm. Unassembled LPS binds to MucB (RseB), thus antagonizing the protective effect of MucB (RseB) on MucA (RseA). The unfolded proteins are bound to the AlgW (DegS) protease (1), which together with MucP (RseP) (2) cleaves MucA (RseA), releasing AlgU (σ^E), which then can associate with the core RNA polymerase (RNAP). The degradation of MucA (RseA) is completed by the cytoplasmic protease ClpX (3). The protease MucD can repress RIP, presumably by degrading and/or chaperoning misfolded or accumulated proteins in the periplasm, thereby preventing or limiting AlgW (DegS) activation.

AlgU-dependent promoter control (primary AlgU regulon) or only indirectly affected by AlgU. In a study investigating the regulons of ten *P. aeruginosa* σ factors, 372 genes have been identified as belonging to the AlgU regulon, out of which 341 were considered as constituting the primary AlgU regulon [30].

AlgU is embedded into a highly complex regulatory network since its regulon includes numerous genes coding for known or putative regulatory proteins, among which two other σ factors (the heat-shock non-ECF σ RpoH [9] and the ECF σ factor SbrI) and a number of transcriptional regulators and TCSs [30] (Fig. 3, Table S2). Four of these regulatory genes are also part of the SigX regulon, and three of them are connected (*i.e.* they share some regulon members in common) to SigX, revealing a moderate cross-talk between AlgU and SigX, which are the two main ECF σ in terms of regulon size and number of regulatory genes controlled [30].

Altogether, these studies confirmed that AlgU is a key regulator for alginate production, stress response and cell envelope homeostasis, and furthermore indicated that AlgU is involved in pathogenesis by other means than alginate over-production and in numerous other cell activities *via* its contribution to the global regulatory network of *P. aeruginosa*.

2.1.4. Examples of other functions than alginate production and stress response regulated by AlgU

In non-mucoid and non-stressed bacteria, AlgU is considered as sequestered by MucA and thus inactive or with a very low basal activity. However, about 33% AlgU was found to be cytoplasmic in wild-

type PAO1 cells [46], suggesting that the basal AlgU activity might not be so negligible and that AlgU could be involved in other functions than stress response and alginate over-production. It also suggests that the AlgU-dependent gene regulation is more complex than just an ON/OFF system and would appear to be a dose-dependent activation system [37]. Rau et al. [59] proposed that “the most important pleiotropic effect of AlgU activation might not be alginate overproduction, but rather one or a collection of the other aforementioned pleiotropic effects” [59]. We therefore focus here on studies experimentally documenting the AlgU involvement in other functions than alginate production and stress response. The main difference in all articles collected was the strains used, clinical or laboratory strain (PAO1/PAK and PA14 strains produce different polysaccharides for example) and mutant strains (*mucA*, *algD*, or *algU+*). This and the complexity of the AlgU regulon probably explain why some results seem to be contradictory.

2.1.4.1. Exopolysaccharides

Exopolysaccharides are involved in biofilm formation, and their production is crucial in chronic *P. aeruginosa* infection. In *P. aeruginosa*, there are at least three exopolysaccharides (alginate, Pel, Psl), which are not produced by all strains. Mucooid strains over-produce at least alginate and non-mucooid strains produce Pel and/or Psl. Using an *algU* mutant without applying any envelope stress, it was shown that AlgU contributes to biofilm robustness of the non-mucooid PAO1 strain and that AlgU indirectly induced the transcription of several biofilm-related genes including *ppyR* and *psl*, but not *pel* [60]. This is in line with the positive control of *psl* expression by the PpyR regulator [61]. Using a

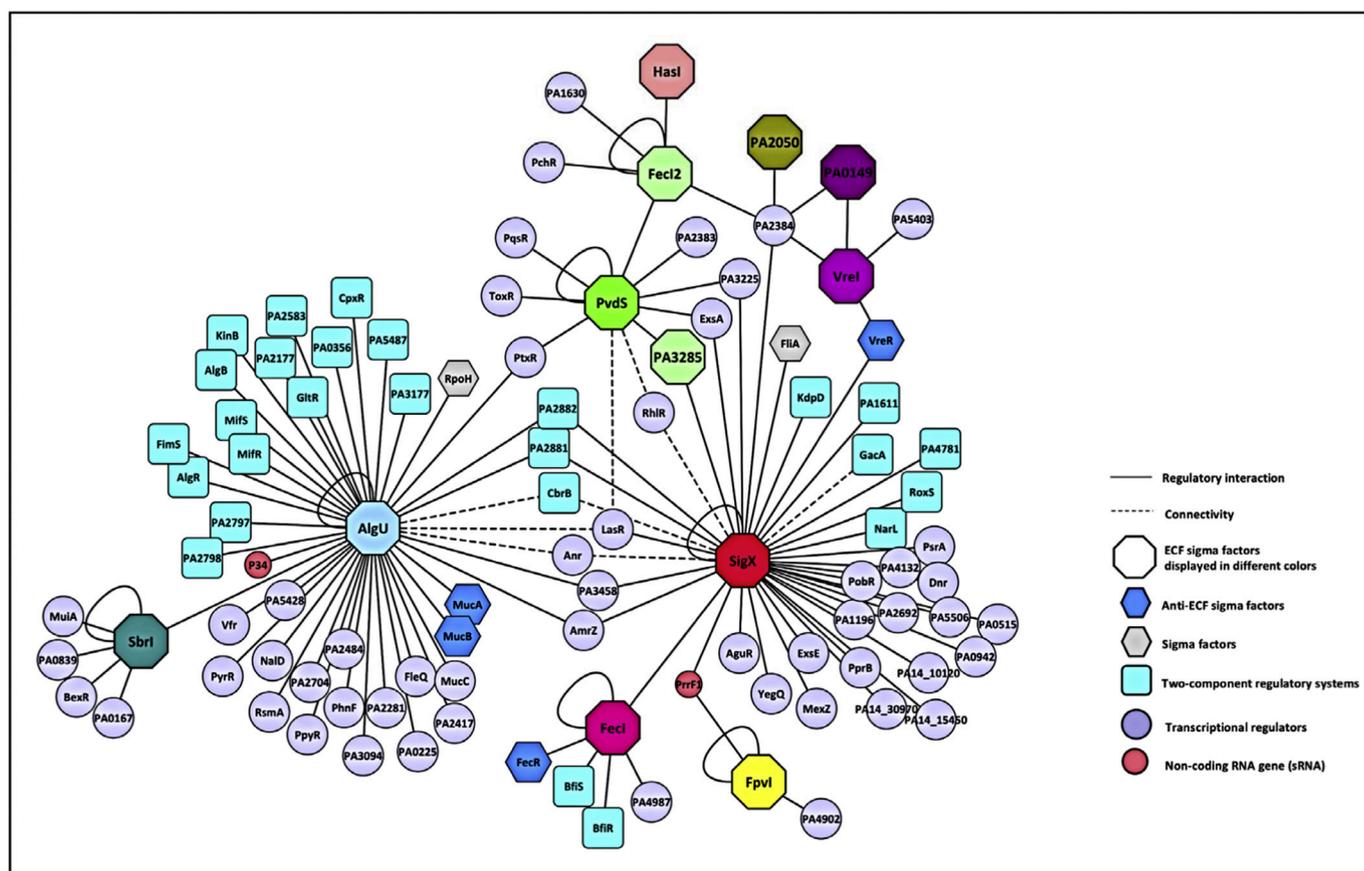


Fig. 3. Relationships between ECF σ and regulators. The direct or indirect involvement of several ECF σ in the expression of regulators (σ factors, TCSs, transcriptional regulators, small RNAs, anti- σ factors) was retrieved from the literature (see Table S2 for details). A graphical reconstruction of the interaction network between regulators and ECF σ was built and visualized by Cytoscape software version 3.2.1 [157]. Full lines indicate direct or indirect regulation of regulator expression by ECF σ . Dotted lines indicate the connectivity between ECF σ and regulators, i. e. members belonging both to the ECF σ and to the regulator regulons (as described in Schulz et al. [29]).

mucA mutant strain, in which AlgU is hyper-active, a decrease of *psl* but not of *pel* transcription was observed, which could be the consequence of the increase in alginate production, suggesting an inter-dependent production of each exopolysaccharide [62]. These authors also proposed that a high concentration of AlgU can act as an inhibitor for *psl* to maintain it off. In a *mucA* mutant strain, the hyper-activity of AlgU directly induces transcription of *rsmA* which encodes a global post-transcriptional regulator [63] (Fig. 3, Table S2). Wood and Ohman [64] compared the AlgU stress regulon with genes activated during biofilm formation and found that 59% on the 293 AlgU-dependent genes were also activated in biofilm [64]. They especially investigated 27 genes with undefined functions and found that 7 of them inhibited AlgU activity, one only in planktonic condition, 4 only in sessile condition, and 2 in both conditions, confirming that AlgU plays role in biofilm robustness independently of alginate production [60].

In the non-mucoid PAO1 strain, RsmA was previously shown to inhibit exopolysaccharide production [65]. The results from these studies indicated that depending on its concentration, AlgU can either induce or inhibit Psl production at both transcriptional and post-transcriptional levels via RsmA. At high concentration, AlgU indirectly inhibits the production of exopolysaccharides other than alginates whereas at basal concentration AlgU induces exopolysaccharide production to probably compensate the absence or low amount of alginate. These results suggested how exopolysaccharides production can be fine-tuned in non-mucoid strains at the transcriptional level by AlgU and at the post-transcriptional level by RsmA and suggested a key role for AlgU in the polysaccharide production switch.

2.1.4.2. Virulence factors. A *mucA* mutation (hyper-active AlgU) inhibits the transcription of many genes involved in virulence, leading to a reduced production of pyocyanin, rhamnolipids, proteins of type III and type VI secretion systems, motility factors, chemotaxis proteins, Rhl quorum sensing proteins, and hydrogen cyanide (HCN) enzyme production [59]. It has already been shown that AlgR inhibits *hcn* genes transcription in non-mucoid strains whereas it activates their transcription in a mucoid strain [66]. The authors suggested that AlgR is able of switching from a repressor in the non-mucoid phenotype to an activator in mucoid *P. aeruginosa* [66]. The *lecB* gene encoding a lectin involved in biofilm formation and post-transcriptional type IV pilus biogenesis, was positively controlled by AlgU [60], strengthening the involvement of AlgU in adhesion and mobility.

The Vfr major regulator of virulence is activated by binding cyclic AMP (cAMP) and positively controls quorum sensing and virulence-associated genes [67]. In a *P. aeruginosa* PAK *mucA* mutant strain, several virulence factors are inhibited as in *vfr* mutants [68]. The same authors showed that *algU* over-expression was responsible for *vfr* inhibition via AlgR independently of alginate over-production [68]. These findings confirmed a previous study, which underlined the key function of AlgU in the control of the switch from acute (production of virulence factors) to chronic infections (biofilm formation) [69].

Comparing mucoid and non-mucoid strains, AlgU oppositely regulates the production of alginate and flagellum, although the lack of flagellum is not the consequence of alginate production [70]. Using a microarray approach, it was confirmed that AlgU negatively controls the *fleQ* regulator gene [71] and the same group demonstrated that AlgU positively controls the *amrZ* gene encoding a regulator which

binds in the *fleQ* promoter region to inhibit its transcription [72] (Fig. 3, Table S2). FleQ is a transcriptional regulator which positively controls flagellum genes and negatively *pel* genes [73,74]. AmrZ is an activator of *algD* and *cdrA* (encoding a biofilm matrix protein) transcription, while repressing its own expression, as well as Psl biosynthesis enzymes and virulence factors [75]. The switch to de-repression of *pel* genes and to non-activation of flagellar genes involves *c*-di-GMP, presumably by a change of FleQ conformation when binding to *c*-di-GMP [76,77]. PpyR could also participate to this regulation since this AlgU-dependent protein inhibits motility and induces Psl production [60,61]. To sum up, FleQ activity is negatively controlled at the transcriptional level by AlgU via AmrZ, and at the post-transcriptional level by an increase of *c*-di-GMP concentration. This FleQ inhibition leads to a de-repression of *pel* genes, which was not observed in the conditions used in two studies [60,62].

2.2. The newly characterized ECF σ factor SigX

2.2.1. Genomic context and regulation of expression

SigX is a 23.5 kDa protein that has recently emerged in the literature, and its cellular functions as well as its regulon have been partially clarified. The closest functional homologue of SigX sharing 49% of similarity is SigW from *Bacillus subtilis*, which regulates membrane fluidity by changing the branched-to-linear fatty acid ratio [78].

The genomic context of the *sigX* gene from *ppsA* to *oprF* is fully conserved in all sequenced genomes of members of the *Pseudomonas* genus (572 genomes) [26]. RT-PCR experiments revealed transcriptional linkages between the *estX*, *menG*, *cmaX*, *cfrX*, *cmpX*, *sigX* and *oprF* genes (PA1771 to PA1777) [79]. So far, only *cmaX-cfrX-cmpX* are predicted to belong to the same operon, while the other genes are annotated as generating monocistronic transcripts [26]. Among these genes, only the OmpA family OprF major porin has been extensively studied and found to be involved in numerous important functions, including cell wall structure maintenance, nutrients import, signaling, virulence and biofilm formation (reviewed in Chevalier et al. [80]).

As for other ECF σ , SigX auto-regulates itself as evidenced in different comparative transcriptomics studies [30,81,82], ChiPseq data [82] and qRT-PCR analysis [83]. RACE-PCR experiments identified a transcriptional start site, located 30 nucleotides upstream of the putative *sigX* translational start codon. From this site, two putative -35 and -10 sequences were identified, and these consisted of ATGAC-N16-ATGAA sequences, which shared approximately 40 and 80% identity with the -10 and -35 σ^{70} consensus sequences, respectively [84]. However, these sequences did not bear much resemblance to the other two tentative motifs [79,82], suggesting that i) this promoter region might be indirectly activated by SigX, and/or ii) that other promoter regions initiating *sigX* transcription are present upstream of this intergenic region, and/or iii) that the so far identified motifs are not those that are recognized by SigX. Direct binding of specific promoter regions should now be investigated to precisely characterize the SigX binding site on DNA.

Several conditions were shown to increase *sigX* expression and SigX activity, such as low shear stress [85], sublethal concentrations of D-cycloserine [36], the absence of the major porin OprF [86], LB containing 342 mM of sucrose [84,87], or low osmolarity LB [79,82,84] (Fig. 1), suggesting that SigX could respond to conditions leading to cell wall stresses. The promoter region identified by Bouffartigues et al. [84] was activated in the 3 latter conditions [84,87], but it was only about 2-fold lowered in the *sigX* mutant, suggesting that SigX only partially controls the transcription of its own gene and that other transcriptional regulators would be involved. The putative complexity of *sigX* expression is depicted in Fig. 4 and Table S3. Briefly, ChiPseq analyses suggest that RpoD would favor *sigX* transcription [29] while the histone-like nucleoid-structuring (H-NS) family member MvaT could negatively regulate it [88]. Transcriptomic studies indicate that *sigX* expression was lowered in mutants of genes for virulence

regulators as AlgR, MvfR, or Hfq. AlgR is the transcriptional regulator of the FimS/AlgR TCS that is required for expression of multiple virulence factors, including type IV pili and alginate in *P. aeruginosa* [89]. MvfR (PqsR) acts as the receptor for the *Pseudomonas* quinolone signal and controls the production of 2-alkyl-4-quinolone molecules, which are important for *P. aeruginosa* pathogenicity [90] and the RNA chaperone Hfq regulates virulence and metabolism in *P. aeruginosa* [91]. Conversely, *sigX* transcription was increased by 2.75-fold in a PA2384 mutant strain grown to stationary phase. The Fur/Zur family PA2384 repressor has been shown to play a role in the regulation of iron uptake [92], suggesting a link between SigX and iron homeostasis. Finally, an AmrZ-binding site has been identified by ChIP-Seq upstream of *P. fluorescens* F113 *sigX* [93], suggesting that AmrZ could be involved in the regulation of *sigX* expression in *P. aeruginosa* as well. Interestingly, in strain PA14, over-expression of *sigX* led to high SigX protein levels after 6 h of over-expression, while strongly decreasing after 18 h of growth [83]. Taken together, these data suggest that SigX expression and production might be highly complex and fine-tuned and indicate that SigX levels are controlled both at mRNA and protein levels.

2.2.2. SigX activity: towards a new mechanosensitive transduction system?

Up to now, SigX is considered as being an orphan ECF σ , since no obvious anti- σ factor was shown to be encoded by the same operon and none has been so far described to regulate its activity. Noticeably, a comprehensive analysis of the ECF σ family [11], based on sequence similarity and domain architecture of the sigma factors and by additional features including putative cognate anti- σ factors, genomic context conservation, and potential target promoter motifs, led to suggest CfrX (PA1774) as SigX putative cognate anti- σ factor. This protein, although lacking the structural anti- σ - σ domains showed nevertheless a shorter N-terminal extension labelled as candidate anti- σ domain [11]. Furthermore, this analysis revealed unique features suggesting novel mechanisms of ECF σ -mediated signal transduction, which could be the case for SigX, although much remains to be discovered. Interestingly, *cmpX*, which is in an operon with *cfrX* lying directly upstream of *sigX*, is predicted to encode a 274 amino acids cytoplasmic membrane protein containing a MscS functional domain, which is characteristic of small mechano-sensitive channels. These ubiquitous proteins are involved in sensing mechanical stimuli at the membrane level, which in turn are converted into an electrical or chemical signal by the cells in a process called mechano-transduction [94]. It is therefore tempting to speculate that at least SigX, CfrX and CmpX may belong to a new type of mechanical transduction system that remains to be discovered as well as the mechanism of its activation in *P. aeruginosa* (Fig. 1).

2.2.3. The SigX regulatory network

Usually, the genes located in the near vicinity of an ECF σ gene belong to its regulon. SigX was first shown to be involved in *oprF* transcription in *P. aeruginosa* [79,84]. However, while SigX has been shown to be involved in *oprF* transcription in *P. aeruginosa* H103 [79,81,84], this has not been clearly established in strain PA14 where it was not significantly affected by a *sigX* deletion although the *oprF* promoter region was successfully immuno-precipitated by SigX using a ChIP-seq approach [82]. The two genes *cfrX* and *cmpX* directly upstream of *sigX* were also shown to belong to the SigX regulon [81,82]. Despite the *in silico* analysis based-prediction of the three genes *cmaX-cfrX-cmpX* (PA1773-PA1775) forming an operonic structure [26], *cmaX* was not identified as a member of SigX regulon neither by transcriptomics [81,82], nor by ChiPseq [82]. In addition, conditions leading to SigX activity did not increase *cmaX* expression while enhancing that of *cfrX* and *cmpX*, suggesting that *cfrX* and *cmpX* belong to the same operonic structure, but not *cmaX*.

To get further insights into the SigX regulon, a first transcriptomic study has been performed on *P. aeruginosa* PAO1 grown to mid log phase in M9 minimal medium containing glucose as carbon source [81]. Under these conditions, the *sigX* mutant and PAO1 displayed

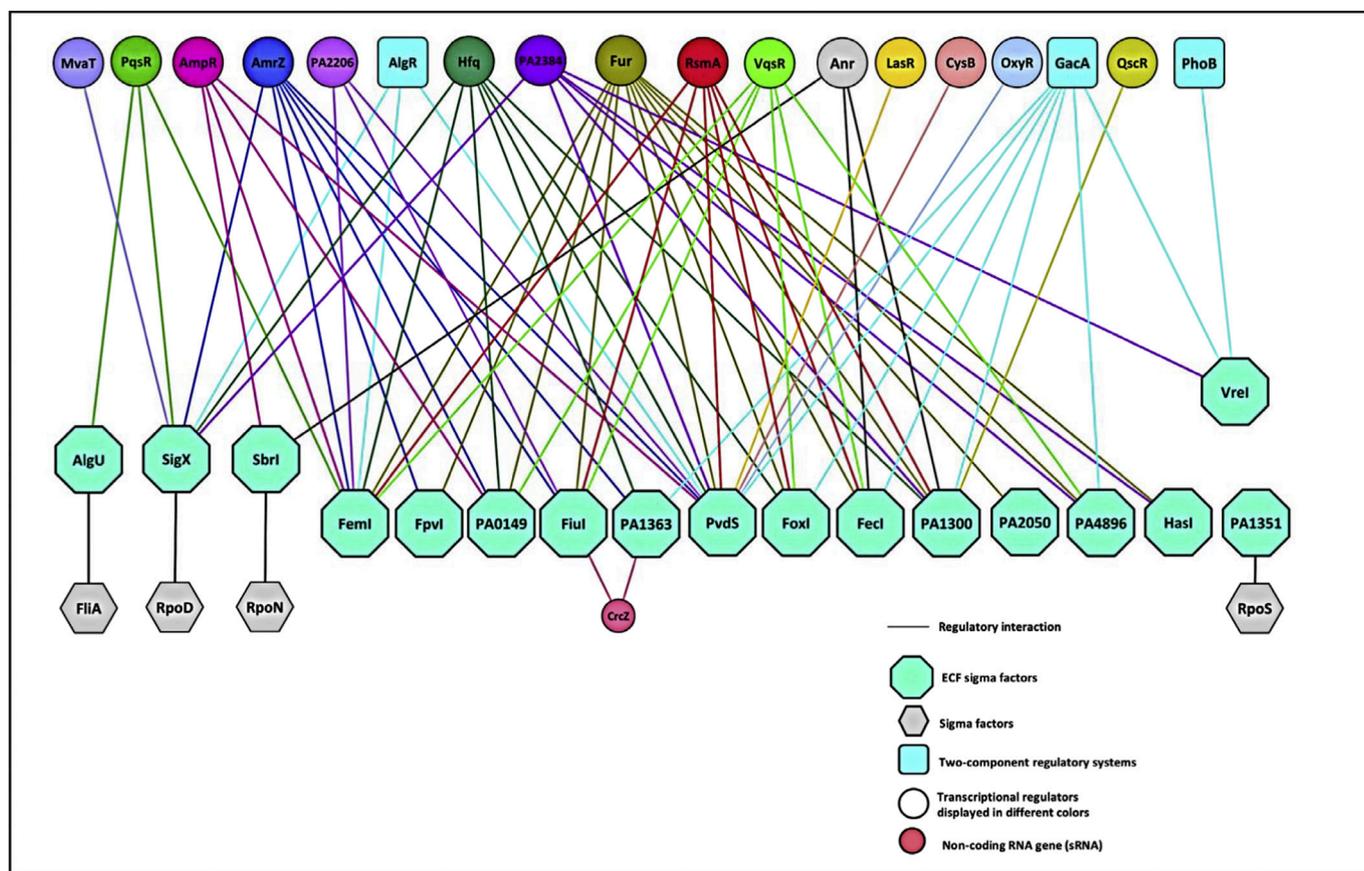


Fig. 4. Involvement of regulators in ECF σ expression and activity. The direct or indirect involvement of several regulators (σ factors, TCSs, transcriptional regulators, small RNAs) in the expression or activity (anti- σ factors) of ECF σ was retrieved from the literature (see Table S3 for details). A graphical reconstruction of the interaction network between regulators and ECF σ was built and visualized by Cytoscape software version 3.2.1 [157].

similar growths and 307 genes were differentially expressed among which 153 and 154 were down- and up-regulated, respectively, suggesting numerous indirect regulations [81]. A second study investigated the SigX regulon through the transcriptional profiles upon *sigX* over-expression and deletion in *P. aeruginosa* PA14 grown in LB containing a low salt concentration (8 mM NaCl) [82], in which the growth of both strains was deeply altered compared to the wild-type PA14 [82,84]. A total of 255 and 247 genes were down- and up-regulated, respectively, in the PA14 *sigX* mutant. In the *sigX* over-expressing strain, 191 genes were down-regulated while 374 were up-regulated. Recently, Schulz et al. analysis led to a SigX primary regulon of 347 genes, corresponding to 265 transcription units. However, to date no direct interaction between this ECF σ and the promoter regions of these putative target genes was demonstrated *in vitro*, nor could a clear binding motif be determined [30].

2.2.3.1. Involvement of SigX in the regulation of fatty acid biosynthesis. In PA14, SigX has been shown to be involved in the control of expression of genes belonging to *de novo* fatty acids biosynthesis pathway [82,83] (Table 2). The biotin-dependent enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) carboxylates acetyl CoA to malonyl CoA in the first step of long chain fatty acids biosynthesis [95]. An increase of *accA*, *accB* and *accD* transcription is observed when *sigX* is over-expressed [82], which is confirmed at protein level [83]. Other genes involved in fatty acid biosynthesis show a decreased expression in the *sigX* mutant, and an increase upon *sigX* over-expression, including those corresponding to the two subsequent steps of the initiation of fatty acid biosynthesis [95], *fabD* (PA2968) and *fabY* (PA5174). *FabD* is the enzyme that transfers the malonyl moiety from malonyl-CoA to an acyl-carrier protein (ACP) to form malonyl-ACP while the β -keto acyl synthase

FabY performs the condensation of malonyl-CoA with acetyl-CoA to form β -keto acyl-ACP [95]. The increased production of these two enzymes was also evidenced in the *sigX* over-expressing strain [83]. Other fatty acids biosynthesis genes show a similar trend, *fabH3*, *fabB*, *fabV* and *fabG* (Table 2). Noteworthy, Blanka et al. confirmed that *accA*, *accB*, *fabB*, *fabD*, *fabG*, *fabY*, and *fabV* genes are part of the SigX regulon, based on Chip-seq and expression data [82] (Table 2). Over-production of SigX resulted in an enrichment of short chain fatty acids in the membranes, including hexadecanoic acid (C16) and, to a lesser extent, hexadecenoic acid (C16:1) [83]. A *sigX* mutant was strongly impaired in the production of C16:1 fatty acids [82]. Accordingly, anisotropy assays showed an increased membrane fluidity for the SigX over-producing strain compared to the wild-type strain. This strain was more resistant to a cold shock while more susceptible to a heat shock [83]. Since fatty acids are also incorporated in coenzymes, quorum sensing signal molecules, siderophores and biosurfactants, making this class of compounds essential for most cellular processes, it is likely that SigX would influence many other phenotypes.

In addition to changes in membrane lipids composition, a *sigX* mutant was affected in its outer membrane protein content [96]. Indeed, proteomic investigations on a *sigX* mutant revealed lower amounts of 8 OMPs among which 4 were TonB-dependent transporters (TBDT) involved in iron or heme uptake (PhuR, FpvA, FpvB, ChtA), the porin OprF, and the three substrate-specific porins OprD, OprQ and OprE. On the other side, the glucose-specific porin OprB and the lipid A 3-O-deacylase PagL that is involved in LPS modification were up-regulated in a *sigX* mutant of *P. aeruginosa* PAO1 [96]. Taken together, these studies strongly suggest the involvement of SigX in membrane fluidity and homeostasis *via* direct and/or indirect control (Fig. 1).

Table 2

SigX is involved in fatty acids biosynthesis.

Expression (fold change) of several putative SigX targets at the levels of proteins* [83] and mRNA** [82] comparing a SigX over-producing strain or a mutant strain to the wild-type (WT, *P. aeruginosa* PA14). SigX regulon was defined as described by Schulz et al. [30].

PA14 n°	PAO1 n°	Gene	Function	sigX over-expression		ΔsigX/WT	SigX regulon
				Protein*	mRNA**	mRNA**	
PA14_01240	PA0102		Carbonic anhydrase	Up	Up		Yes
PA14_25650	PA2968	<i>fabD</i>	Malonyl-CoA transacylase	Up	Up	Down	Yes
PA14_25660	PA2967	<i>fabG</i>	β-Oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase	Up	Up	Down	Yes
PA14_68360	PA5174	<i>fabY</i>	β-Oxoacyl synthase	Up	Up	Down	Yes
PA14_17270	PA3639	<i>accA</i>	Acetyl-CoA carboxylase α	Up	Up	Down	Yes
PA14_64100	PA4847	<i>accB</i>	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier	Up	Up	ND	Yes
PA14_23860	PA3112	<i>accD</i>	Acetyl-CoA carboxylase β	Up	Up	ND	ND
PA14_57050	PA4389	<i>fabG2</i>	β-Oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase	Up	ND	ND	ND
PA14_25900	PA2950	<i>fabV</i>	Trans-2-enoyl-CoA reductase	Up	Up	Down	Yes
PA14_21540	PA3286	<i>fabH3</i>	β-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	Up	Up	ND	Yes
PA14_43690	PA1609	<i>fabB</i>	β-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase I	Up	Up	Down	Yes
PA14_46490	PA1973	<i>fabF2</i>	β-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	Up	Up	ND	ND

ND: not determined.

2.2.3.2. Involvement of SigX in the regulation of iron uptake

SigX seems also to be involved in the regulation of iron uptake in *P. aeruginosa*. In a transcriptome study comparing the *sigX* mutant and wild-type PAO1 grown in M9 glucose medium, the genes PA3405-3408 which code for the components of the Has hemophore-mediated heme uptake system were strongly down-regulated in the *sigX* mutant [81] although SigX is not predicted to be a direct effector of these genes in the Schulz et al. study [30]. Likewise, several genes for the biosynthesis (*pchABCD*, *pchEF*) and uptake (*fptA*) of pyochelin are also down-regulated in the PAO1 *sigX* mutant [81], although also not predicted to be direct SigX targets [30], suggesting an indirect effect of the absence of SigX. It should be mentioned that SigX is predicted to directly regulate the *prfF1* small RNA gene [30], which is involved in the post-transcriptional repression of iron sequestration under iron starvation conditions [97]. When looking at the Supplementary data of Schulz et al., there is evidence for direct interactions of SigX with *foxA* (encoding a ferrioxamine TBDT) and several pyoverdine genes (*pvdL*, *fpvFEKJHG*, *pvdLJD*, and *fpvA*) [30]. The Fur/Zur PA2384 repressor was shown to play a role in the regulation of iron uptake [92] and its gene is 4.5-fold up-regulated in a *sigX* over-expressing PA14 strain [82]. Even more interesting, the expression of *sigX* is 2.7-fold increased in a PA2384 mutant in stationary phase [92], suggesting a major role for this regulator (see other sections, AlgU and iron starvation ECFσ) (Fig. 4, Table S3).

2.2.3.3. Involvement of SigX in virulence of *P. aeruginosa*.

Cytotoxicity of the wild-type strain and a *sigX* mutant was evaluated in two separate studies that were conducted on two different *P. aeruginosa* strains, PA14 [82] and PAO1 [81], using different growth conditions as previously mentioned. *In vitro*, the PA14 *sigX* mutant showed a reduced cytotoxicity on A549 epithelial pulmonary cells [82], and a similar effect was observed for the PAO1 *sigX* mutant on Caco2/TC7 intestine cells [81]. *In vivo*, the PAO1 *sigX* mutant displayed a slightly reduced virulence on the nematode *Caenorhabditis elegans* [81]. In addition, the PAO1 *sigX* mutant produced lower levels of exotoxin A and pyocyanin and displayed a decreased adherence on Caco2/TC7 cells [81]. In PA14, a total of 27 genes, the products of which are involved in type III secretion system (T3SS), were down-regulated in a *sigX* mutant and up-regulated in the *sigX* over-expressing strain [82]. In PAO1, genes related to type I secretion system (Apr, Has and Bap), the Xcp type II secretion system and the H3-type VI secretion system (T6SS) were down-regulated in the *sigX* mutant strain, while genes related to T3SS and H1-T6SS were up-regulated [81]. Two genes coding for extracellular toxins were strongly down-regulated in the PAO1 *sigX* mutant, *toxA* and *prpL*, which are known to be regulated by PvdS ECFσ (see section on

iron starvation ECFσ) [98,99]. Varying the salt concentrations did not influence the cytotoxicity the PA14 wild-type strain, whereas the *sigX* mutant became more cytotoxic in LB supplemented with 120 mM NaCl compared to very low (8 mM) or high (500 mM) NaCl concentrations [82]. Taken together, these data suggest that SigX is involved in *P. aeruginosa* virulence, but with sometimes opposite effects comparing both studies, which can be due to the differences in strain and growth conditions or to SigX indirect regulation (Fig. 1).

2.2.3.4. Involvement of SigX in motility, attachment and biofilm formation.

P. aeruginosa is capable of three types of motilities, i.e. swimming that requires functional flagella, swarming that is a complex social behavior depending on type IV pili, flagella and rhamnolipids, and twitching that is mostly related to type IV pili [100]. While a *sigX* mutation did not affect swimming, swarming was nearly abolished both in PA14 and PAO1, while twitching was abolished in PAO1, but remained unaffected in PA14 [81,82]. In PAO1, *pilA* encoding the pilin subunit PilA of the Type IV pilus, and *flp* that encodes the Type IVb pilin, were markedly down-regulated (49 and 17-fold, respectively) in the *sigX* mutant [81]. In addition, genes belonging to the *tad* operon encoding the Tad machinery that assembles Type IVb pilin, and the *cupE* operon encoding a non-archetypal chaperon-usher system responsible for assembling cell-surface associated fimbrial structures were down-regulated in the PAO1 *sigX* mutant [81]. Noticeably, in PAO1 ΔsigX, *pprB* was down-regulated. PprB is the response regulator of the PprA/PprB TCS, which directly and positively controls the expression of the three systems involved in biofilm formation, namely the Type IVb Flp pili [101], the CupE fimbriae [102] and the Bap adhesion system [103]. Accordingly, the PAO1 *sigX* mutant was affected in adhesion onto glass slides and Caco2/TC7 cells, and showed a reduced biofilm formation capacity [81]. Conversely, when SigX was activated (high sucrose concentration, *oprF* mutant strain), biofilm formation was increased, at least partly by over-producing the exopolysaccharide matrix component Pel, but not Psl, and increased expression of the putative SigX targets *gcbA* and PA1181 that are involved in c-di-GMP metabolism [80,85,104]. However, this was not the case in PA14 [82] where the *sigX* mutant displayed a higher capacity to produce biofilm when grown in LB containing 120 mM NaCl or 240 mM sucrose, but not in low or high osmolarity conditions, in which the biofilm production was similar or reduced compared to that of the wild-type strain, respectively [82]. These data were correlated with the production of the second messenger c-di-GMP that positively controls the regulation of biofilm formation [105]. Interestingly, the primary regulon of SigX in this study includes the 4 genes PA14_37690 (PA2072), PA14_49160 (PA1181), PA14_63210 (PA4781), PA14_64050

(PA4843, *gcbA*) that encode a GGDEF and/or EAL or HD-GYP domain protein which were previously associated to *c*-di-GMP turnover [106]. Taken together, these studies again reflect the difficulty when comparing data generated using different strains and growth conditions, and show that SigX strongly affects motility, attachment and biofilm formation, but as for virulence, probably mainly by exerting an indirect control of at least some of the genes involved in these phenotypes (Fig. 1).

2.2.3.5. Involvement of SigX in antibiotic resistance and susceptibility. Because some of the genes so far predicted as part of the SigX regulon are membrane-associated, SigX has been suspected to be involved in maintaining the composition of the membrane and may therefore play a critical role in modulating the ability of antimicrobials to reach their targets in the cell wall. A *sigX* mutant was shown to be more sensitive to imipenem and polymyxin B by 4 and 2-fold, respectively, and 1.5- to 2-fold more resistant to the fluoroquinolone enoxacin, when grown in LB medium [79]. When cultivated in M9 minimal medium containing glucose as sole carbon source [81], the *sigX* mutant strain was slightly more resistant to the aminoglycosides kanamycin and gentamicin and to the fluoroquinolone norfloxacin, but 4 to 30-fold more resistant to tetracycline, nalidixic acid and erythromycin, which could be at least partly attributed to the MexXY/OprM efflux pump activity. Indeed, under these conditions, the expression of the *mexXY* gene cluster encoding components of the MexXY/OprM pump involved in aminoglycoside efflux [107] was strongly up-regulated in the PAO1 *sigX* mutant strain (6 to 13-fold) [81]. The *mexZ* gene encoding the TetR-like repressor of the *mexXY* operon was 5-fold up-regulated, indicating that the *mexXY* dysregulation was independent of MexZ. This might rather result from the up-regulation of the *prfH*-PA5471 gene cluster (6 to 7-fold), the products of which modulate the activity of MexZ [108] (Fig. 1).

2.2.4. Relationships between SigX and major regulators

Using an *in silico* approach based on regulatory interactions retrieved from the literature (Table S2), it appears that SigX might be directly or indirectly associated to numerous regulators (TCSSs, σ factors or other types of transcriptional regulators) and one small RNA (PrrF1) (Fig. 3). Among these regulators, 10 σ factors were found more or less closely related or connected (*i.e.* each of them and SigX could regulate common subsets of genes), including the iron responsive ECF σ FecI, PvdS, FecI2 (in PA14), HasI, FpvI, and PA0149 as well as PA2050 *via* the virulence regulator σ^{Vrel} , and the two cell wall stress responsive ECF σ AlgU and SbrI, comforting the involvement of SigX in iron homeostasis and in the envelope stress response. In addition, SigX putative target genes were identified to be over-represented in the regulons of the transcription factors Anr, CbrB, GacA, LasR and RhlR [109]. The CbrA/CbrB TCS is involved in the regulation of the utilization of multiple carbon and nitrogen sources [110], metabolism, virulence and antibiotic resistance in *P. aeruginosa* [111]. LasR and RhlR are key players of the complex quorum sensing network [112], the GacS/GacA TCS is involved in the switch between planktonic and sessile lifestyles [113], and Anr is a global regulator of anaerobiosis in *P. aeruginosa* [114]. Altogether, these data suggest that SigX is entangled into numerous complex regulatory networks, by exerting direct and indirect control as depicted in Fig. 3.

2.3. The recently identified SbrI ECF σ

PA2896 and PA2895 constitute a pair of ECF σ /anti- σ factors that have been recently named SbrI and SbrR, respectively, because of their involvement in controlling swarming motility and biofilm formation in *P. aeruginosa* [115]. The N-terminal region of SbrR interacts with SbrI inhibiting its activity, showing that SbrR is SbrI cognate anti- σ factor. Transcription from the *sbrI* promoter is negatively regulated by SbrR and positively by SbrI. Defining the SbrIR regulon using DNA

microarrays resulted in the identification of a relatively small regulon of about 21 genes whose expression changed by more than 2-fold (Table S1). The expression of three genes, *muiA*, the hypothetical protein PA4495 and *sbrI* was strongly influenced by the deletion of *sbrR*. MuiA was recently identified as a novel inhibitor of alginate over-production, and over-production of *muiA* resulted in decreased alginate production and P_{algD} promoter activity [116]. By aligning the transcription start sites of *sbrI*, *muiA*, and PA4495 derived from RNA-seq data, Seo and Darwin identified putative -10 and -35 promoter elements with the sequence TAACCCG-N₁₆-CGTCTCA-N₆-A (+1) [117]. Using the Find Individual Motif Occurrences program to search for this putative SbrI-dependent promoter sequence in the PAO1 and PA14 genomes revealed statistically significant matches to this consensus only in the promoters of *sbrI*, *muiA*, and PA4495, suggesting that the primary SbrI regulon likely consists of these three genes.

SbrI/R influences biofilm formation and swarming motility by controlling the expression of *muiA* [115] (Fig. 1). Cells lacking SbrR are unable to engage in swarming motility and exhibit increased biofilm formation due to the SbrI-dependent increase in *muiA* expression. However, the involvement of MuiA in this phenotype may not be related to its involvement as inhibitor of alginate production. Noteworthy, *muiA* and PA4495 were highly expressed in a *retS* mutant, in which the GacA/S TCS is activated, leading to the production of biofilm [118].

Previous work has shown that the expression of *sbrI*, *muiA*, and PA4495 becomes elevated following hyperosmotic shock [119], treatment with the cell wall-inhibitory antibiotic D-cycloserine [50], and ectopic expression of the periplasmic protease CtpA, which leads to disruption of the cell envelope [117]. In addition, MuiA was shown to be up-regulated when *P. aeruginosa* is exposed to azithromycin [120,121] and hydrogen peroxide [122]. Taken together, this data suggest that cell envelope stress might be sensed by SbrR, leading to SbrI activation, expression of *muiA*, and transition from motile swarming cells to growth as a biofilm [115].

2.4. Cross-talk between cell wall stress responsive ECF σ factors AlgU, SigX and SbrI

Schulz et al. [30] identified putative primary regulons of AlgU and SigX in *P. aeruginosa* PA14 grown in LB medium [30]. In these conditions, SigX and AlgU primary regulons gathered 347 (265 transcription units) and 341 (247 transcription units) genes, respectively. Among these genes, 15 were suggested to be co-regulated by these two ECF σ factors, suggesting a moderate cross-talk between SigX and AlgU. In addition, *sbrI* was shown to be a member of AlgU regulon, and *sigX* expression was also up-regulated in some conditions leading to AlgU activity [50], suggesting that these three-cell wall stress response ECF σ regulators could act coordinately in certain circumstances. However, since the overlap of their regulon is quite marginal (Fig. 3, Table S1), these data suggest that they certainly have common functions, but also that they would have very specific ones. If so, it is conceivable that in some cases, they need to be activated while the other should be silenced. For example, a treatment with D-cycloserine leads to increased expression and activity of the three ECF σ factors [37,115]. Remarkably, this was not the case for *P. aeruginosa* or *P. fluorescens* response to osmolarity, since AlgU (in case of *P. fluorescens* [123]), or AlgU and SbrI were both activated in response to hyperosmolarity [115,119], while SigX was active in hypo-osmolar conditions [82,84]. Altogether, these data suggest that ECF σ factors would control expression and or activity of the other ones in certain circumstances. Deciphering the fine-tuning of this control is now a future challenge since silencing these ECF σ would weaken *P. aeruginosa*, and help developing new anti-*P. aeruginosa* strategies.

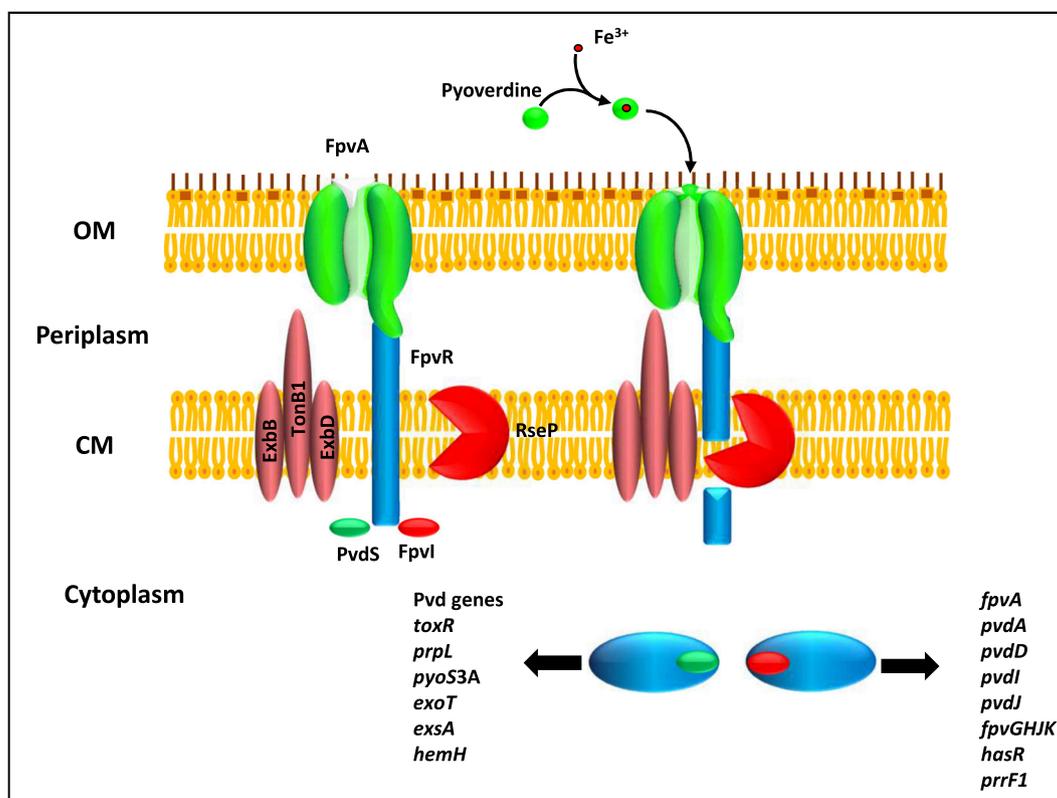


Fig. 5. Cell-surface signaling mediated by the interaction of ferripyoverdine with the outer membrane transporter FpvA.

Left panel: In the absence of ferripyoverdine, the FpvA transporter in the outer membrane interacts with the anti- σ FpvR protein, which sequesters the two ECF σ , PvdS and FpvI. Right panel: when the pyoverdine siderophore binds iron to form ferripyoverdine, the interaction of the ferric siderophore with FpvA triggers a conformational change, resulting in the proteolytic cleavage of FpvR by RseP and subsequent liberation of the two ECF σ , which are now able to associate with RNAP. For a complete list of PvdS and FpvI gene targets, please refer to Supplementary Table S1.

3. The iron starvation ECF σ

Among the 19 ECF σ of *P. aeruginosa* PAO1 [9], 14 are involved in the activation of the transcription of TonB-dependent transporters (TBDT) for siderophores or heme [124] (Table 1, Fig. 1). Activity of these iron starvation ECF σ is controlled by a signaling cascade that starts at the outer membrane and ends in the cytoplasm [15]. This regulatory mechanism, known as cell-surface signaling (CSS), was first described for the ECF σ -anti- σ FecI/FecR pair in *E. coli* [125]. Two ECF σ , PvdS and FpvI, regulate the biosynthesis and the uptake of the pyoverdine siderophore, respectively (Fig. 5) [126,127].

3.1. The PvdS and FpvI ECF σ response to iron limitation

The iron starvation ECF σ expression occurs under iron limitation and is controlled by the Fur general iron response regulator, which acts as a repressor when complexed with Fe²⁺ [16,126,127]. PvdS and FpvI are both sequestered by the N-terminal cytoplasmic domain of the anti- σ FpvR protein [14,128] (Fig. 5). When ferripyoverdine binds the outer membrane FpvA transporter, a signaling cascade is triggered, which results in proteolysis of FpvR and the release of the two ECF σ factors, which can associate with the core RNAP and activate the transcription of their respective regulon (Fig. 5). In addition, *pvdS* and *fpvI* expression is repressed under high iron condition by the Fur repressor [15], although this repression is stronger for *pvdS* compared to *fpvI* [128].

3.1.1. The PvdS regulon, not only pyoverdine biosynthesis and uptake

A first transcriptome analysis of *P. aeruginosa* response to iron limitation identified and described a TAAAT-N16/17-CGT binding motif upstream of PvdS-dependent genes [129] (Fig. 6). Interestingly, PvdS

has been shown to activate the transcription of two extracellular virulence factors, exotoxin A and the PrpL protease [98,99]. An in-depth analysis of the PvdS regulon in the plant pathogen *P. syringae* revealed a larger PvdS regulon than previously thought [130]. The regulons (sigmulons) of several *P. aeruginosa* PA14 σ factors, including PvdS and FpvI have been recently determined, which increased the PvdS regulon to about 80 genes [30] (Table S1). The PA14 PvdS sigmulon includes several T3SS genes: *exsA* coding for the T3SS major regulator, and the *exoT* and *exoS* coding for T3SS toxins. The exotoxin A regulator gene *toxR* (*regA*) is also a PvdS target, in line with the known PvdS-dependent production of exotoxin A [98]. Noteworthy is the predicted regulation by PvdS of the pyocin S3 gene, a bacteriocin targeting *P. aeruginosa* strains producing the type II FpvA ferripyoverdine transporter [131]. Interestingly, PvdS is predicted to control the transcription of another ECF σ factor, PA14_21540 (PA3285), which is unexpectedly not linked to a gene encoding an anti- σ factor or a TBDT. The ferredoxin-like *hemH* gene is also mentioned to be PvdS-dependent [30]. HemH adds iron to the protoporphyrin IX molecule in the last step of heme biosynthesis [132]. In a *P. fluorescens* *hemH* mutant pyoverdine production is strongly affected and could be restored by *hemH* complementation, suggesting a link between *de novo* heme biogenesis and pyoverdine production [133]. PvdS and RpoS co-regulate the *sspB-sspA*-PA4429-4431 genes. SspA and SspB are stringency induced starvation proteins and SspA works as an anti- σ factor for the main RpoD σ^{70} protein while *sspA* over-expression caused a mucoid phenotype in *P. aeruginosa* [134]. PvdS also regulates the PA3225 gene encoding a LysR-type regulator involved in antibiotic resistance in *P. aeruginosa* [135] (Fig. 3).

3.1.2. The complex *pvdS* gene regulation

The *pvdS* gene is primarily regulated by the Fur regulator

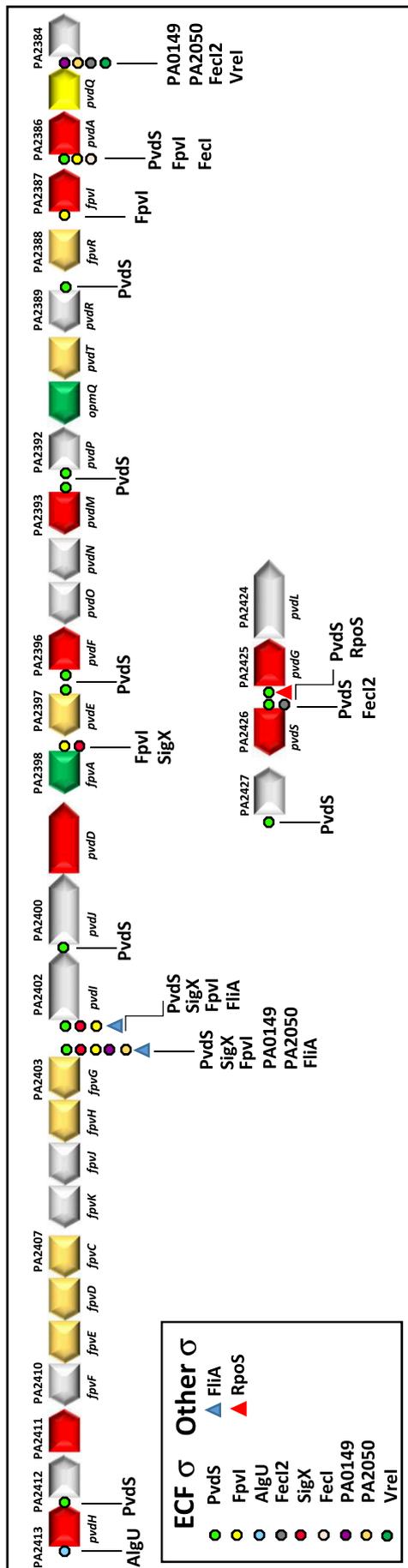


Fig. 6. The *P. aeruginosa* pyoverdine gene cluster.

The pyoverdine genes form two separate clusters in the genome: PA2427-*pvdS*-*pvdG*-*pvdL* and all the remaining genes, from *pvdH* to PA2384. Green dots represent PvdS binding sites. Other σ factor binding sites are presented by dots of different colors and are indicated when they interact. Genes are indicated in the same colors as on the Pseudomonas.com website [25] (red: cytoplasmic protein, orange: cytoplasmic membrane protein, yellow: periplasmic protein, green: OMP, grey: unknown localization).

[16,126,127,129] (Fig. 4, Table S1). However, *pvdS* regulation appears more complex, involving other regulators as depicted in Fig. 4 [15]. Briefly, *pvdS* transcription is influenced by oxygen since expression of *pvdS* and *toxR* (*regA*) is strongly decreased under microaerobic conditions [98]. A direct binding of two LysR-type regulators, OxyR and PA2206, to the *pvdS* control regions has been demonstrated [136,137]. Interestingly, OxyR and PA2206 are both involved in the response to oxidative stress [136,137], suggesting a protective role of pyoverdine production under oxidative stress conditions. Using the *pvdS* promoter region as a bait, the CysB LysR-type regulator of sulfur homeostasis was found to be an activator of *pvdS* transcription [138], which could be linked to the biogenesis of iron-sulfur proteins [16,138].

3.1.3. The *FpvI* regulon, not only *fpvA* regulation

Compared to PvdS, the FpvI regulon is quite small, comprising the *fpvA* gene, but also some pyoverdine biosynthesis genes, including *pvdA* and the *pvdIJD* genes encoding the non-ribosomal peptide synthetases for the elongation of the pyoverdine peptide chain [30,127] (Fig. 6, Table S1). The TBDT *hasR* gene is also predicted to be part of the FpvI regulon, which means that FpvI regulates one heme uptake transporter [30,139]. The PA4902 gene encoding a LysR-type regulator of unknown function is also FpvI-dependent [29] (Fig. 3). Finally, the *prfF1* small RNA gene, which is regulated by SigX, belongs to the FpvI regulon [30]. The PrrF1 and PrrF2 sRNAs are Fur-regulated and, under iron starvation conditions, act as translation repressors of genes involved in iron sequestration, such as bacterioferritin and the Fe-co-factored SodB superoxide dismutase [97]. Using an *in vivo* RNA ligation method, more PrrF1 target RNAs have been identified, including mRNAs for different iron-containing proteins, such as catalases, cytochromes, [Fe-S] proteins, SodB, and the OprF porin [140].

3.2. The *FecI* ECF σ regulator

FecI regulates the expression of the FecA ferric citrate transporter [141]. Unexpectedly, the PA14 FecI regulon does not include *fecA*, which is under the control of another ECF σ , FecI2, present only in PA14 [30]. The FecI regulon also includes the BfiS/BfiR TCS known to be important for biofilm formation by *P. aeruginosa* [142] (Fig. 3, Table S1). The *pvdA* gene, which is regulated by PvdS and FpvI, is also controlled by FecI (Fig. 6). This is also the case for *hasR*, which is regulated by both FpvI and FecI. The FecI regulon also comprises the PA1922 gene which codes for an uncharacterized TBDT. Interestingly, the *oprG* gene is regulated by FecI, suggesting that the small OprG porin could be involved in the uptake of Fe²⁺ in *P. aeruginosa* [80] (Table S1).

3.3. Sigma factor regulons cross-talk in the regulation of pyoverdine biosynthesis and uptake

The *fpvGHJKDEF* pyoverdine genes are under the control of six different σ factors (PvdS, FpvI, SigX, FliA, PA0149, PA2050) (Fig. 6). FpvG is a ferripyoverdine reductase, and the FpvC periplasmic protein chelates the released Fe²⁺ [143], which constitutes a unique iron release mechanism. While *fpvGHJKDEF* control by PvdS, FpvI, FliA is probably direct, PA0149 and PA2050 ECF σ regulation could be mediated by the PA2384 product which is a winged-helix regulator of the Fur/Zur family [92,144]. Likewise, the *pvdIJD* genes are also regulated by FliA, PvdS, FpvI and SigX, but not by PA0149 and PA2050 [30] while the pyoverdine chromophore *pvdL* gene [127] is co-regulated by PvdS and by the stationary phase sigma factor RpoS [29]. The *fpvA* gene is regulated by FpvI, but also by SigX while *pvdA* is co-regulated by PvdS, FpvI and FecI (Fig. 6). As already mentioned, both FpvI and SigX control the transcription of the *prfF1* small RNA (Fig. 3).

3.4. The *FecI2* ECF σ in PA14 strain

The *fecI2* gene (PA14_27690) is present in the majority of *P.*

aeruginosa genomes, but not in PAO1 [26]. The FecI2 regulon is small (29 genes) and comprises some genes uniquely found in PA14 (6 genes), including *fecI2* itself [29]. FecI2 regulates the expression of several transcriptional regulators, including the PvdS and HasI ECF σ (Fig. 3, Table S1), suggesting a role in the control of pyoverdine biosynthesis and heme uptake via the HasAP secreted hemophore protein and the HasR TBDT [145]. The second heme transporter gene, *phuR* [145], is also under the control of FecI2 as well as a putative third heme transporter encoded by *hxcC* [146]. FecI2 also controls the pyochelin siderophore *pchR* gene encoding an AraC-type regulator [147], establishing a link between ferripyochelin and heme uptake regulation via a common ECF σ (Fig. 3). The already mentioned PA14_33830 (PA2384) gene encoding a regulator of the Fur/Zur family [144] also belongs to the FecI2 regulon.

3.5. ECF σ factors involved in the regulation of extraneous iron uptake

Next to pyoverdine and pyochelin, *P. aeruginosa* can utilize siderophores or iron chelates produced by other microorganisms in what is termed “siderophore piracy” [148]. *P. aeruginosa* possesses several TBDT for heterologous siderophores and three involved in heme uptake [146]. A majority of the TBDT genes are controlled by a CSS similar to the ferripyoverdine uptake one [15] (Fig. 1). PA0472 (*fiuI*) and PA0471 (*fiuR*) encode the ECF σ and the anti- σ , respectively and control the ferric ferrichrome FiuA TBDT [15,16]. Likewise, the FoxI/FoxR pair regulates the uptake of ferrioxamine by the FoxA TBDT [15,16]. FemI/FemR together regulate the uptake of carboxy mycobactin by the FemA TBDT [144]. The Has heme uptake system involves the HasAP secreted hemophore, which binds heme and brings it to the HasR TBDT, both *hasAP* and *hasR* genes being under the control of the HasI/HasR ECF σ /anti- σ pair [139]. As already mentioned, the PA0149 ECF σ regulates the expression of the PA0151 TBDT, but also of the regulator PA2384 and the *fpvGHJKDEF* gene cluster [15,16,144] (Fig. 6, Table S1). The PA2050 ECF σ controls the expression of two TBDTs, PA2057 and PA2070 [15,16,144] and, like PA0149 ECF σ , PA2384 and the *fpvGHJKDEF* cluster (Fig. 6, Table S1). Llamas et al. also investigated the regulon of PA2093 and PA4896 ECF σ factors and found that PA2093 regulates the PA2089 TBDT gene, and the putative PA2090-2094 operon. The PA4896 ECF σ controls the expression of two TBDTs, PA4897 and PA2590 [144]. Interestingly, PA4896 also regulates several bacteriocin genes encoding R- and F-pyocins, also termed tailocins [149] and the gene for the soluble pore-forming S5 pyocin (PA0985) which targets the FptA ferripyochelin TBDT [150].

4. σ^{VreI} sigma factor: an a-typical cell-surface signaling system

σ^{VreI} , which was first annotated as PigD [144], is encoded by *vreI* that belongs to the *vreAIR* operon (PA0674-0676) [151]. The *vreA* (*pigC*) and *vreR* genes encode a CSS-like transporter and the anti- σ , respectively [151]. This three-protein system has been termed the PUMA3 CSS [151].

Upon *vreI* over-expression, 29 genes showed a modified expression, including those encoding the Hxc type II secretion system, and the two-partner secretion genes for the secretion of the LapA alkaline phosphatase (PA0688) and a high-molecular weight adhesion protein (PA0690) [151] (Table S1). In the PUMA3 CSS system, the *fpvH* gene, also under PA0149 and PA2384 control, is up-regulated when *vreI* is over-expressed [144,151]. This result establishes a link between PA0149 and σ^{VreI} and the pyoverdine system. It is therefore tempting to think that these two factors could explain, at least in part, the bacterial virulence enhancement assigned to σ^{VreI} . More transcriptomic studies need to be performed using different experimental conditions since the PUMA3 CSS is suspected to be activated in contact of human airway epithelial cells [152,153].

σ^{VreI} activation is totally dependent on the PhoB regulator [154] and a search for PhoB binding sites revealed that the promoters of both

pdvA and *phdA* genes represent PhoB targets [154], both genes belonging to the σ^{VreI} regulon. Among the 106 genes that are differentially expressed in a *phoB* mutant strain compared to the PA14 wild-type, *vreA*, *vreI* and *vreR* have been identified as well as the genes from PA0691 to PA0699 [155]. In conditions of inorganic phosphate (Pi) restriction, PhoB binds directly on the *vreA* promoter region, resulting in the transcription of the whole *vreAIR* operon [154,156]. Interestingly, σ^{VreI} is unable to bind to the *vreA* promoter region [154], suggesting that another σ factor controls the *vreAIR* operon transcription in cooperation with the PhoB regulator. A possible candidate is the already described PA0149 ECF σ [144] since its transcription is seven-fold increased when *vreI* is over-expressed [151]. In both σ^{VreI} and PA0149 over-expressing strains, the transcription of the Fur/Zur regulator PA2384 [92] and the *fpvGHJK* genes is enhanced [144,151]. In the same line, *vreI* expression is decreased in a PA2384 mutant, in support for a central role for this regulator (see also the paragraph on iron starvation ECF σ) (Fig. 4, Table S1). It has also been shown that SigX exerts a control on *vreR* expression [82].

The PUMA3 CSS is an a-typical CSS. In a conventional CSS, the TBDT senses its specific ligand inducing a conformational change of the TonB protein, allowing both the ligand entrance and the proteolytic cleavage of the anti- σ factor (Fig. 1), releasing the σ factor to bind the core RNAP. In the PUMA3 CSS, the VreA receptor is significantly shorter than the other TBDTs, suggesting that VreA could be in the periplasm playing only a sensor role without transporter activity and therefore not activated by a TonB protein [151]. Two models of activation of the PUMA3 have been proposed [15]. The first one proposes that VreA acts as a link between an unidentified TBDT and the VreR protein. In the second hypothesis, free periplasmic VreA is directly activated by an unknown signal, changing its configuration, allowing binding with VreR, resulting in σ^{VreI} release in the cytoplasm [14]. In favor of the first hypothesis, the PA0149 ECF σ which is regulated by σ^{VreI} also regulates the transcription of the PA0151 gene coding for a TBDT [144]. The other feature that differentiates σ^{VreI} from the iron starvation ECF σ factors is that the *vreAIR* operon is regulated by Pi, and not iron [151]. All together these data suggest that σ^{VreI} , which has a low number of target genes, seems to function as a modulator of other transcriptional factors or depends on the contribution of other transcriptional factors.

5. Conclusion

Indicative of the growing interest about ECF σ , extensive studies have focused on the regulatory pathways leading to their activity. As described in this review, in addition to the complexity of their activation mechanisms, unraveling the pathways leading to their expression will be a future challenge, since they could be under the control of numerous regulatory elements like TCS and/or sncRNAs. Altogether, these data suggest that many signals or inputs may lead to produce these ECF σ , which then need to be activated via RIP or other uncovered pathways, as it could be the case for SigX. Partial crosstalk between ECF σ and/or with other regulatory elements like TCS, further suggest an exquisite fine-tuning of their control at various levels (expression, production, activity...), which will probably present a future challenge to develop new anti-*P. aeruginosa* strategies.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008>.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008> associated this article can be found, in online version.

Acknowledgments

The Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment is

supported by the Evreux Portes de Normandie (EPN), the Région Normandie, and the UE (European Regional Development Fund, FEDER). The Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines is supported by the Région Bretagne and European FEDER.

References

- [1] A.J. Spiers, A. Buckling, P.B. Rainey, The causes of *Pseudomonas* diversity, *Microbiology* 146 (2000) 2345–2350.
- [2] J.B. Lyczak, C.L. Cannon, G.B. Pier, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1051–1060.
- [3] R.T. Sadikot, T.S. Blackwell, J.W. Christman, A.S. Prince, Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005) 1209–1223.
- [4] M.L. Lambert, C. Suetens, A. Savey, M. Palomar, M. Hiesmayr, I. Morales, A. Agodi, U. Frank, K. Mertens, M. Schumacher, M. Wolkewitz, Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study, *Lancet Infect. Dis.* 11 (2011) 30–38.
- [5] T.F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G.C. Walker, P.S. Stewart, G.A. O'Toole, A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance, *Nature* 426 (2003) 306–310.
- [6] S. Haussler, B. Tummler, H. Weissbrodt, M. Rohde, I. Steinmetz, Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, *Clin. Infect. Dis.* 29 (1999) 621–625.
- [7] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warriner, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory, M.V. Olson, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature* 406 (2000) 959–964.
- [8] A. Rodrigue, Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, M. Foglino, Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* 8 (2000) 498–504.
- [9] E. Potvin, F. Sanschagrin, R.C. Levesque, Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008) 38–55.
- [10] M.S. Paget, J.D. Helmann, The σ^{70} family of sigma factors, *Genome Biol.* 4 (2003) 203.
- [11] A. Staron, H.J. Sofia, S. Dietrich, L.E. Ulrich, H. Liesegang, T. Mascher, The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family, *Mol. Microbiol.* 74 (2009) 557–581.
- [12] J.D. Helmann, The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors, *Adv. Microb. Physiol.* 46 (2002) 47–110.
- [13] S.E. Barchinger, S.E. Ades, Regulated proteolysis: control of the *Escherichia coli* σ^E -dependent cell envelope stress response, *Subcell Biochem.* 66 (2013) 129–160.
- [14] S. Campagne, F.H. Allain, J.A. Vorholt, Extra cytoplasmic function sigma factors, recent structural insights into promoter recognition and regulation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 30 (2015) 71–78.
- [15] M.A. Llamas, F. Imperi, P. Visca, I.L. Lamont, Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity, *FEMS Microbiol. Rev.* 38 (2014) 569–597.
- [16] P. Cornelis, S. Matthijs, L. Van Oeffelen, Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biometals* 22 (2009) 15–22.
- [17] T.L. Raivio, T.J. Silhavy, Periplasmic stress and ECF sigma factors, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 591–624.
- [18] J.B. Lyczak, C.L. Cannon, G.B. Pier, Lung infections associated with cystic fibrosis, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 194–222.
- [19] J.R. Govan, V. Deretic, Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 539–574.
- [20] D.M. Ramsey, D.J. Wozniak, Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 309–322.
- [21] M.J. Franklin, D.E. Nivens, J.T. Weadge, P.L. Howell, Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl, *Front. Microbiol.* 2 (2011) 167.
- [22] I.D. Hay, Y. Wang, M.F. Moradali, Z.U. Rehman, B.H. Rehm, Genetics and regulation of bacterial alginate production, *Environ. Microbiol.* 16 (2014) 2997–3011.
- [23] D.W. Martin, B.W. Holloway, V. Deretic, Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 1153–1164.
- [24] C.D. Hershberger, R.W. Ye, M.R. Parsek, Z.D. Xie, A.M. Chakrabarty, The algT (algU) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative sigma factor (σ^E), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7941–7945.
- [25] M.J. Schurr, H. Yu, J.M. Martinez-Salazar, N.S. Hibler, V. Deretic, Biochemical characterization and posttranslational modification of AlgU, a regulator of stress response in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 (1995) 874–880.
- [26] G.L. Winsor, E.J. Griffiths, R. Lo, B.K. Dhillon, J.A. Shay, F.S. Brinkman, Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D646–653.
- [27] C.A. DeVries, D.E. Ohman, Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in algT, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6677–6687.
- [28] D.W. Martin, M.J. Schurr, H. Yu, V. Deretic, Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to σ^E and stress response, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6688–6696.
- [29] A.M. Firoved, J.C. Boucher, V. Deretic, Global genomic analysis of AlgU (sigma (E))-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 1057–1064.
- [30] S. Schulz, D. Eckweiler, A. Bielecka, T. Nicolai, R. Franke, A. Dotsch, K. Hornischer, S. Bruchmann, J. Duvel, S. Haussler, Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk, *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1004744.
- [31] M.J. Schurr, H. Yu, J.M. Martinez-Salazar, J.C. Boucher, V. Deretic, Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4997–5004.
- [32] Z.D. Xie, C.D. Hershberger, S. Shankar, R.W. Ye, A.M. Chakrabarty, Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4990–4996.
- [33] M.J. Schurr, D.W. Martin, M.H. Mudd, V. Deretic, Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 3375–3382.
- [34] K. Mathee, C.J. McPherson, D.E. Ohman, Posttranslational control of the algT (algU)-encoded σ^{22} for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN), *J. Bacteriol.* 179 (1997) 3711–3720.
- [35] E.A. Campbell, J.L. Tupy, T.M. Gruber, S. Wang, M.M. Sharp, C.A. Gross, S.A. Darst, Crystal structure of *Escherichia coli* σ^E with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA, *Mol. Cell* 11 (2003) 1067–1078.
- [36] D.W. Martin, M.J. Schurr, M.H. Mudd, V. Deretic, Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of mucB causes conversion to mucoidy, *Mol. Microbiol.* 9 (1993) 497–506.
- [37] L.F. Wood, D.E. Ohman, Use of cell wall stress to characterize σ^{22} (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 72 (2009) 183–201.
- [38] Y. Okkotsu, A.S. Little, M.J. Schurr, The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (2014) 82.
- [39] C.L. Pritchett, A.S. Little, Y. Okkotsu, A. Frisk, W.L. Cody, C.R. Covey, M.J. Schurr, Expression analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component regulatory system, *J. Bacteriol.* 197 (2015) 736–748.
- [40] D.W. Martin, M.J. Schurr, M.H. Mudd, J.R. Govan, B.W. Holloway, V. Deretic, Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 8377–8381.
- [41] J.C. Boucher, H. Yu, M.H. Mudd, V. Deretic, Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3838–3846.
- [42] G. Pulcrano, D.V. Iula, V. Raia, F. Rossano, M.R. Catania, Different mutations in mucA gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on algU gene expression, *New Microbiol.* 35 (2012) 295–305.
- [43] O. Ciofu, B. Lee, M. Johannesson, N.O. Hermansen, P. Meyer, N. Hoiby, C. Scandinavian Cystic Fibrosis Study, Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants, *Microbiology* 154 (2008) 103–113.
- [44] M. Anthony, B. Rose, M.B. Pegler, M. Elkins, H. Service, K. Thamotharampillai, J. Watson, M. Robinson, P. Bye, J. Merlino, C. Harbour, Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 2772–2778.
- [45] A. Bragonzi, L. Wiehlmann, J. Klockgether, N. Cramer, D. Worlitzsch, G. Doring, B. Tummler, Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *Microbiology* 152 (2006) 3261–3269.
- [46] D.W. Rowen, V. Deretic, Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 314–327.
- [47] M.J. Schurr, H. Yu, J.C. Boucher, N.S. Hibler, V. Deretic, Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (σ^E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 5670–5679.
- [48] S.A. Reiling, J.A. Jansen, B.J. Henley, S. Singh, C. Chattin, M. Chandler, D.W. Rowen, Prc protease promotes mucoidy in mucA mutants of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 151 (2005) 2251–2261.
- [49] F.H. Damron, J.B. Goldberg, Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 84 (2012) 595–607.
- [50] L.F. Wood, A.J. Leech, D.E. Ohman, Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of σ^{22} (AlgT) and the AlgW and Prc proteases, *Mol. Microbiol.* 62 (2006) 412–426.
- [51] D. Qiu, V.M. Eisinger, D.W. Rowen, H.D. Yu, Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 8107–8112.
- [52] D. Qiu, V.M. Eisinger, N.E. Head, G.B. Pier, H.D. Yu, ClpXP proteases positively

- regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 154 (2008) 2119–2130.
- [53] B.O. Cezairliyan, R.T. Sauer, Control of *Pseudomonas aeruginosa* AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB, *Mol. Microbiol.* 72 (2009) 368–379.
- [54] S. Lima, M.S. Guo, R. Chaba, C.A. Gross, R.T. Sauer, Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress, *Science* 340 (2013) 837–841.
- [55] J.C. Boucher, M.J. Schurr, H. Yu, D.W. Rowen, V. Deretic, *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of mucC in the regulation of alginate production and stress sensitivity, *Microbiology* 143 (1997) 3473–3480.
- [56] A.M. Firoved, V. Deretic, Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 1071–1081.
- [57] A.M. Firoved, W. Ornatowski, V. Deretic, Microarray analysis reveals induction of lipoprotein genes in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: implications for inflammation in cystic fibrosis, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5012–5018.
- [58] U. Qaisar, C.J. Kruzcek, M. Azeem, N. Javaid, J.A. Colmer-Hamood, A.N. Hamood, The *Pseudomonas aeruginosa* extracellular secondary metabolite, Paerucumarin, chelates iron and is not localized to extracellular membrane vesicles, *J. Microbiol.* 54 (2016) 573–581.
- [59] M.H. Rau, S.K. Hansen, H.K. Johansen, L.E. Thomsen, C.T. Workman, K.F. Nielsen, L. Jelsbak, N. Hoiby, L. Yang, S. Molin, Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 1643–1658.
- [60] A. Bazire, K. Shioya, E. Soum-Southera, E. Bouffartigues, C. Ryder, L. Guentas-Dombrowsky, G. Hemery, I. Linossier, S. Chevalier, D.J. Wozniak, O. Lesouhaitier, A. Dufour, The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 3001–3010.
- [61] C. Attila, A. Ueda, T.K. Wood, PA2663 (PpyR) increases biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 through the psl operon and stimulates virulence and quorum-sensing phenotypes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 293–307.
- [62] A. Ghaffoor, I.D. Hay, B.H. Rehm, Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 5238–5246.
- [63] S.D. Stacey, C.L. Pritchett, *Pseudomonas aeruginosa* AlgU contributes to post-transcriptional activity by increasing rsmA expression in a mucA22 strain, *J. Bacteriol.* 198 (2016) 1812–1826.
- [64] L.F. Wood, D.E. Ohman, Identification of genes in the σ^{22} regulon of *Pseudomonas aeruginosa* required for cell envelope homeostasis in either the planktonic or the sessile mode of growth, *MBio* 3 (2012) e00094-12.
- [65] Y. Irie, M. Starkey, A.N. Edwards, D.J. Wozniak, T. Romeo, M.R. Parsek, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA, *Mol. Microbiol.* 78 (2010) 158–172.
- [66] A.J. Carterson, L.A. Morici, D.W. Jackson, A. Frisk, S.E. Lizewski, R. Jupiter, K. Simpson, D.A. Kunz, S.H. Davis, J.R. Schurr, D.J. Hassett, M.J. Schurr, The transcriptional regulator AlgR controls cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 6837–6844.
- [67] B. Ryall, M. Carrara, J.E. Zlosnik, V. Behrends, X. Lee, Z. Wong, K.E. Lougheed, H.D. Williams, The mucoid switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation, *PLoS One* 9 (2014) e96166.
- [68] A.K. Jones, N.B. Fulcher, G.J. Balzer, M.L. Urbanowski, C.L. Pritchett, M.J. Schurr, T.L. Yahr, M.C. Wolfgang, Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through mucA mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 5709–5717.
- [69] H. Yu, J.C. Boucher, N.S. Hibler, V. Deretic, Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme-stress sigma factor AlgU (σ^S), *Infect. Immun.* 64 (1996) 2774–2781.
- [70] E.S. Garrett, D. Perlegas, D.J. Wozniak, Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU), *J. Bacteriol.* 181 (1999) 7401–7404.
- [71] A.H. Tart, M.C. Wolfgang, D.J. Wozniak, The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 7955–7962.
- [72] A.H. Tart, M.J. Blanks, D.J. Wozniak, The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 6483–6489.
- [73] N. Dasgupta, M.C. Wolfgang, A.L. Goodman, S.K. Arora, J. Jyot, S. Lory, R. Ramphal, A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 50 (2003) 809–824.
- [74] C. Baraquet, K. Murakami, M.R. Parsek, C.S. Harwood, The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 7207–7218.
- [75] C.J. Jones, D. Newsom, B. Kelly, Y. Irie, L.K. Jennings, B. Xu, D.H. Limoli, J.J. Harrison, M.R. Parsek, P. White, D.J. Wozniak, ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS Pathog.* 10 (2014) e1003984.
- [76] C. Baraquet, C.S. Harwood, Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18478–18483.
- [77] J.W. Hickman, C.S. Harwood, Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 376–389.
- [78] A.W. Kingston, C. Subramanian, C.O. Rock, J.D. Helmman, A σ^W -dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity, *Mol. Microbiol.* 81 (2011) 69–79.
- [79] F.S. Brinkman, G. Schoofs, R.E. Hancock, R. De Mot, Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 4746–4754.
- [80] S. Chevalier, E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, A. Dufour, P. Cornelis, Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins, *FEMS Microbiol. Rev.* 41 (2017) 698–722.
- [81] G. Gicquel, E. Bouffartigues, M. Bains, V. Oxaran, T. Rosay, O. Lesouhaitier, N. Connil, A. Bazire, O. Maillot, M. Benard, P. Cornelis, R.E. Hancock, A. Dufour, M.G. Feuilloley, N. Orange, E. Deziel, S. Chevalier, The extra-cytoplasmic function sigma factor SigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 8 (2013) e80407.
- [82] A. Blanka, S. Schulz, D. Eckweiler, R. Franke, A. Bielecka, T. Nicolai, F. Casilag, J. Duvel, W.R. Abraham, V. Kaefer, S. Haussler, Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 345–356.
- [83] A.L. Boechat, G.H. Kaihama, M.J. Politi, F. Lepine, R.L. Baldini, A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 8 (2013) e84775.
- [84] E. Bouffartigues, G. Gicquel, A. Bazire, M. Bains, O. Maillot, J. Vieillard, M.G. Feuilloley, N. Orange, R.E. Hancock, A. Dufour, S. Chevalier, Transcription of the oprF gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 4301–4311.
- [85] A. Crabbe, B. Pycke, R. Van Houdt, P. Monsieurs, C. Nickerson, N. Leys, P. Cornelis, Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 1545–1564.
- [86] E. Bouffartigues, J.A. Moscoso, R. Duchesne, T. Rosay, L. Fito-Boncompagni, G. Gicquel, O. Maillot, M. Benard, A. Bazire, G. Brenner-Weiss, O. Lesouhaitier, P. Lerouge, A. Dufour, N. Orange, M.G. Feuilloley, J. Overhage, A. Filloux, S. Chevalier, The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 630.
- [87] E. Bouffartigues, R. Duchesne, A. Bazire, M. Simon, O. Maillot, A. Dufour, M. Feuilloley, N. Orange, S. Chevalier, Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX, *FEMS Microbiol. Lett.* 356 (2014) 193–200.
- [88] S. Castang, H.R. McManus, K.H. Turner, S.L. Dove, H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 18947–18952.
- [89] L.A. Morici, A.J. Carterson, V.E. Wagner, A. Frisk, J.R. Schurr, K. Honer zu Bentrup, D.J. Hassett, B.H. Iglewski, K. Sauer, M.J. Schurr, *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 7752–7764.
- [90] E. Deziel, S. Gopalan, A.P. Tampakaki, F. Lepine, K.E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, L.G. Rahme, The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-l-homoserine lactones, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 998–1014.
- [91] E. Sonnleitner, M. Schuster, T. Sorger-Domenigg, E.P. Greenberg, U. Blasi, Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 59 (2006) 1542–1558.
- [92] P. Zheng, J. Sun, R. Geffers, A.P. Zeng, Functional characterization of the gene PA2384 in large-scale gene regulation in response to iron starvation in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biotechnol.* 132 (2007) 342–352.
- [93] F. Martinez-Granero, M. Redondo-Nieto, P. Vesga, M. Martin, R. Rivilla, AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaptation in *P. fluorescens* F113, *BMC Genomics* 15 (2014) 237.
- [94] A. Persat, Bacterial mechanotransduction, *Curr. Opin. Microbiol.* 36 (2017) 1–6.
- [95] T. Kondakova, F. D'Heygere, M.J. Feuilloley, N. Orange, H.J. Heipieper, C. Duclairoir Poc, Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*, *Chem. Phys. Lipids* 190 (2015) 27–42.
- [96] R. Duchesne, E. Bouffartigues, V. Oxaran, O. Maillot, M. Benard, M.G. Feuilloley, N. Orange, S. Chevalier, A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition, *J. Proteome* 94 (2013) 451–459.
- [97] P.J. Wilderman, N.A. Sowa, D.J. FitzGerald, P.C. FitzGerald, S. Gottesman, U.A. Ochsner, M.L. Vasil, Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 9792–9797.
- [98] J.M. Gains, N.L. Carty, F. Tiburzi, M. Davinic, P. Visca, J.A. Colmer-Hamood, A.N. Hamood, Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* toxA, regA and ptxR genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen, *Microbiology* 153 (2007) 4219–4233.
- [99] P.J. Wilderman, A.I. Vasil, Z. Johnson, M.J. Wilson, H.E. Cunliffe, I.L. Lamont, M.L. Vasil, Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.* 69 (2001) 5385–5394.
- [100] B.I. Kazmierczak, M. Schniederberend, R. Jain, Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence, *Curr. Opin. Microbiol.* 28 (2015) 78–82.
- [101] C.S. Bernard, C. Bordini, E. Termine, A. Filloux, S. de Bentzmann, Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* tad locus, involved in Flp pilus biology, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 1961–1973.
- [102] C. Giraud, C.S. Bernard, V. Calderon, L. Yang, A. Filloux, S. Molin, G. Fichant,

- C. Bordini, S. de Bentzmann, The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperoneusher pathway system assembling fimbriae, *Environ. Microbiol.* 13 (2011) 666–683.
- [103] S. de Bentzmann, C. Giraud, C.S. Bernard, V. Calderon, F. Ewald, P. Plesiat, C. Nguyen, D. Grunwald, I. Attree, K. Jeannot, M.O. Fauvarque, C. Bordini, Unique biofilm signature, drug susceptibility and decreased virulence in *Drosophila* through the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system PprAB, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1003052.
- [104] E. Sonnleitner, S. Hagens, F. Rosenau, S. Wilhelm, A. Habel, K.E. Jager, U. Blasi, Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1, *Microb. Pathog.* 35 (2003) 217–228.
- [105] R. Hengge, Principles of c-di-GMP signalling in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 263–273.
- [106] M.Y. Galperin, T.A. Gaidenko, A.Y. Mulikidjanian, M. Nakano, C.W. Price, MHYT, a new integral membrane sensor domain, *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 17–23.
- [107] J.R. Aires, T. Kohler, H. Nikaido, P. Plesiat, Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 2624–2628.
- [108] Y. Morita, L. Cao, V.C. Gould, M.B. Avison, K. Poole, nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 8649–8654.
- [109] S.C. Binder, D. Eckweiler, S. Schulz, A. Bielecka, T. Nicolai, R. Franke, S. Haussler, M. Meyer-Hermann, Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22212.
- [110] T. Nishijyo, D. Haas, Y. Itoh, The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 917–931.
- [111] A.T. Yeung, M. Bains, R.E. Hancock, The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 918–931.
- [112] J. Lee, L. Zhang, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein Cell* 6 (2015) 26–41.
- [113] A.L. Goodman, B. Kulasekara, A. Rietsch, D. Boyd, R.S. Smith, S. Lory, A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Dev. Cell* 7 (2004) 745–754.
- [114] K. Schreiber, R. Krieger, B. Benkert, M. Eschbach, H. Arai, M. Schobert, D. Jahn, The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 4310–4314.
- [115] B.A. McGuffie, I. Vallet-Gely, S.L. Dove, Sigma factor and anti-sigma factor that control swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 198 (2015) 755–765.
- [116] T.R. Withers, Y. Yin, H.D. Yu, Identification and characterization of a novel inhibitor of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pathog. Dis.* 70 (2014) 185–188.
- [117] J. Seo, A.J. Darwin, The *Pseudomonas aeruginosa* periplasmic protease CtpA can affect systems that impact its ability to mount both acute and chronic infections, *Infect. Immun.* 81 (2013) 4561–4570.
- [118] A. Brenic, S. Lory, Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA, *Mol. Microbiol.* 72 (2009) 612–632.
- [119] A. Aspedon, K. Palmer, M. Whiteley, Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 2721–2725.
- [120] Y. Nalca, L. Jansch, F. Bredenbruch, R. Geffers, J. Buer, S. Haussler, Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 1680–1688.
- [121] T. Kai, K. Tateda, S. Kimura, Y. Ishii, H. Ito, H. Yoshida, T. Kimura, K. Yamaguchi, A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of lasI or rhlI, in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22 (2009) 483–486.
- [122] W. Chang, D.A. Small, F. Toghrol, W.E. Bentley, Microarray analysis of toxicogenomic effects of peracetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5893–5899.
- [123] U. Schneider-Keel, K.B. Lejbolle, E. Baehler, D. Haas, C. Keel, The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5683–5693.
- [124] I.J. Schalk, G.L. Mislin, K. Brillet, Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters, *Curr. Top. Membr.* 69 (2012) 37–66.
- [125] V. Braun, S. Mahren, A. Sauter, Gene regulation by transmembrane signaling, *Biometals* 19 (2006) 103–113.
- [126] P. Visca, F. Imperi, I.L. Lamont, Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 22–30.
- [127] J. Ravel, P. Cornelis, Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads, *Trends Microbiol.* 11 (2003) 195–200.
- [128] R.J. Edgar, G.E. Hampton, G.P.C. Garcia, M.J. Maher, M.A. Perugini, D.F. Acklerley, I.L. Lamont, Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* (2017) 891–904.
- [129] U.A. Ochsner, P.J. Wilderman, A.I. Vasil, M.L. Vasil, GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes, *Mol. Microbiol.* 45 (2002) 1277–1287.
- [130] B. Swingle, D. Thete, M. Moll, C.R. Myers, D.J. Schneider, S. Cartinhour, Characterization of the PvdS-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals regulon members and insights regarding PvdS function in other pseudomonads, *Mol. Microbiol.* 68 (2008) 871–889.
- [131] C. Baysse, J.M. Meyer, P. Plesiat, V. Geoffroy, Y. Michel-Briand, P. Cornelis, Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3849–3851.
- [132] M.R. O'Brian, L. Thony-Meyer, Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes, *Adv. Microb. Physiol.* 46 (2002) 257–318.
- [133] C. Baysse, S. Matthijs, T. Pattery, P. Cornelis, Impact of mutations in hemA and hemH genes on pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* ATCC17400, *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 57–63.
- [134] Y. Yin, T.R. Withers, X. Wang, H.D. Yu, Evidence for sigma factor competition in the regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 8 (2013) e72329.
- [135] C.W. Hall, L. Zhang, T.F. Mah, PA3225 is a transcriptional repressor of antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) e02114-16.
- [136] F.J. Reen, J.M. Haynes, M.J. Mooij, F. O'Gara, A non-classical LysR-type transcriptional regulator PA2206 is required for an effective oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 8 (2013) e54479.
- [137] Q. Wei, P.N. Minh, A. Dotsch, F. Hildebrand, W. Panmanee, A. Elfarash, S. Schulz, S. Plaisance, D. Charlier, D. Hassett, S. Haussler, P. Cornelis, Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 4320–4333.
- [138] F. Imperi, F. Tiburzi, G.M. Fimia, P. Visca, Transcriptional control of the pvdS iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism CysB in *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 1630–1642.
- [139] U.A. Ochsner, Z. Johnson, M.L. Vasil, Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 146 (2000) 185–198.
- [140] K. Han, B. Tjaden, S. Lory, GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of bacterial small regulatory RNA by in vivo proximity ligation, *Nat. Microbiol.* 2 (2016) 16239.
- [141] B. Marshall, A. Stintzi, C. Gilmour, J.M. Meyer, K. Poole, Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter, *Microbiology* 155 (2009) 305–315.
- [142] O.E. Petrova, K. Sauer, The novel two-component regulatory system BfSR regulates biofilm development by controlling the small RNA rsmZ through CafA, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 5275–5288.
- [143] G. Ganne, K. Brillet, B. Basta, B. Roche, F. Hoegy, V. Gasser, I.J. Schalk, Iron release from the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves three new actors: FpvC, FpvG, and FpvH, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 1056–1065.
- [144] M.A. Llamas, M.J. Mooij, M. Sparrius, C.M. Vandenbroucke-Grauls, C. Ratledge, W. Bitter, Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems, *Mol. Microbiol.* 67 (2008) 458–472.
- [145] A.D. Smith, A. Wilks, Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 7756–7766.
- [146] P. Cornelis, J. Bodilis, A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads, *Environ. Microbiol. Rep.* 1 (2009) 256–262.
- [147] L. Michel, N. Gonzalez, S. Jagdeep, T. Nguyen-Ngoc, C. Reimmann, PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector, *Mol. Microbiol.* 58 (2005) 495–509.
- [148] M.F. Traxler, M.R. Seyedsayamdost, J. Clardy, R. Kolter, Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy, *Mol. Microbiol.* 86 (2012) 628–644.
- [149] M.G. Ghequire, R. De Mot, Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*, *FEMS Microbiol. Rev.* 38 (2014) 523–568.
- [150] A. Elfarash, J. Dingemans, L. Ye, A.A. Hassan, M. Craggs, C. Reimmann, M.S. Thomas, P. Cornelis, Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 160 (2014) 261–269.
- [151] M.A. Llamas, A. van der Sar, B.C. Chu, M. Sparrius, H.J. Vogel, W. Bitter, A novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000572.
- [152] A. Frisk, J.R. Schurr, G. Wang, D.C. Bertucci, L. Marrero, S.H. Hwang, D.J. Hassett, M.J. Schurr, Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* after interaction with human airway epithelial cells, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5433–5438.
- [153] S. Chugani, E.P. Greenberg, The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression, *Microb. Pathog.* 42 (2007) 29–35.
- [154] J.M. Quesada, J.R. Otero-Asman, K.C. Bastiaansen, C. Civantos, M.A. Llamas, The activity of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence regulator σ^{vrel} is modulated by the anti- σ factor VreR and the transcription factor PhoB, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1159.
- [155] P. Bielecki, V. Jensen, W. Schulze, J. Godeke, J. Strehmel, D. Eckweiler, T. Nicolai, A. Bielecka, T. Wille, R.G. Gerlach, S. Haussler, Cross talk between the response regulators PhoB and TetD allows for the integration of diverse environmental signals in *Pseudomonas aeruginosa*, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 6413–6425.
- [156] L.M. Faure, M.A. Llamas, K.C. Bastiaansen, S. de Bentzmann, S. Bigot, Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* σ^{vrel} ECF factor and its target genes, *Microbiology* 159 (2013) 1315–1327.
- [157] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504.

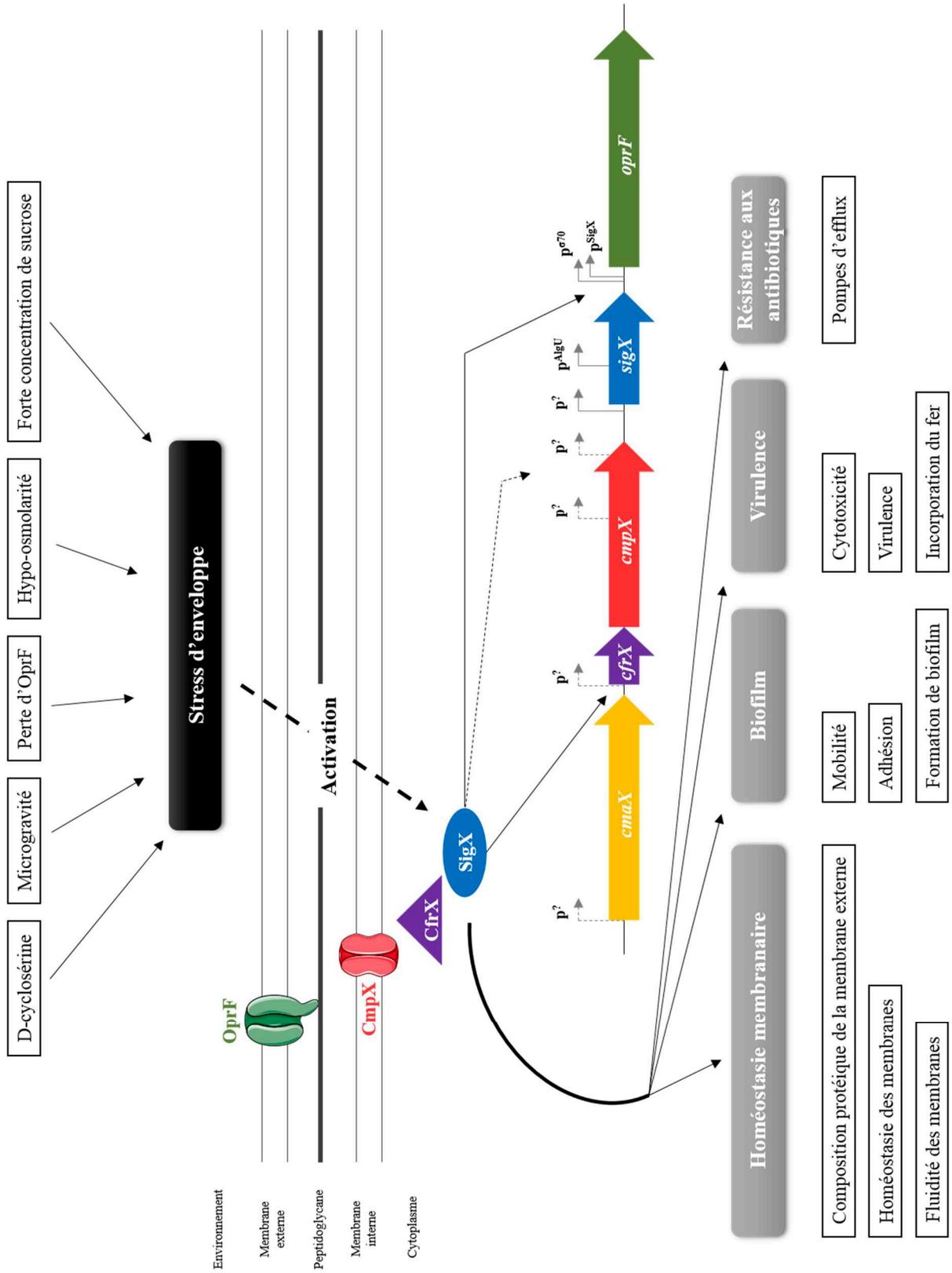


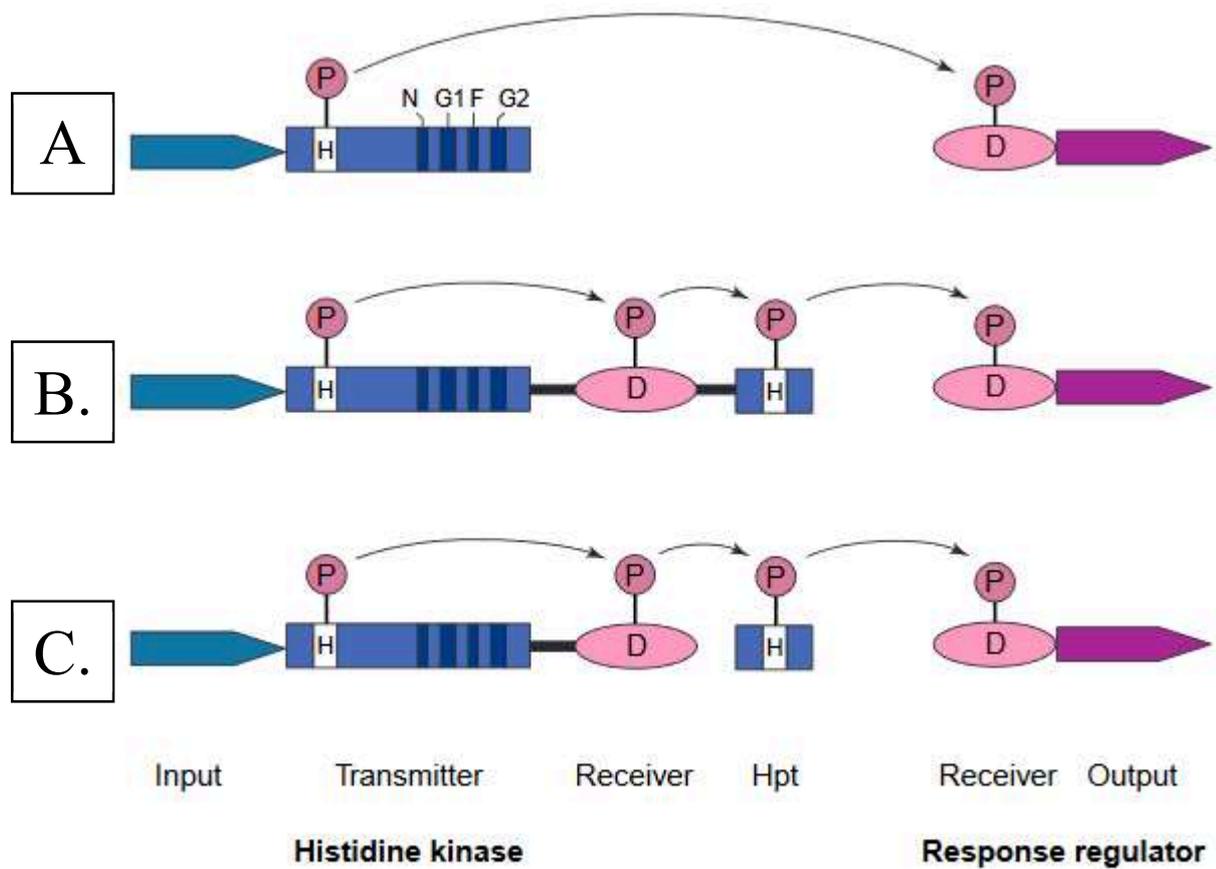
Figure 20. Conditions d'activité, régulation et grandes fonctions de SigX.

Schéma récapitulatif des connaissances au début de ma thèse sur les conditions conduisant à un stress d'enveloppe qui vont activer SigX (Bouffartigues et al., 2015, 2014, 2012; Brinkman et al., 1999; Crabbé et al., 2011; Wood and Ohman, 2009), ses grandes fonctions (Blanka et al., 2014; Boechat et al., 2013; Bouffartigues et al., 2012; Brinkman et al., 1999; Duchesne et al., 2013; Flécharde et al., 2018; Gicquel et al., 2013; Schulz et al., 2015), et son environnement génomique (www.pseudomonas.com). Les régulations par SigX directes (flèches pleines noires) et indirectes (flèches noires en pointillés), ainsi que les promoteurs identifiés (flèches grises pleines), et les promoteurs putatifs (flèches grises en pointillés) sont représentés (Bouffartigues et al., 2012; Brinkman et al., 1999; Chevalier et al., 2018; Firoved et al., 2002).

ii. *SigX*

SigX a été décrit pour la première fois en 1999 (Brinkman et al., 1999), mais est étudié activement depuis 2012 (Blanka et al., 2014; Boechat et al., 2013; Bouffartigues et al., 2014, 2012; Duchesne et al., 2013; Flécharde et al., 2018; Gicquel et al., 2013). Un schéma récapitulatif de l'ensemble des conditions d'activation et des fonctions régulées par SigX est représenté en Figure 20. SigX est activé lors de conditions amenant à une déstabilisation de l'enveloppe, telles que la présence de D-cyclosérine, la perte d'OprF, ou des conditions d'hypo-osmolarité, forte concentration en sucrose ou des conditions de microgravité (Bouffartigues et al., 2015, 2014, 2012; Brinkman et al., 1999; Crabbé et al., 2011; Wood et Ohman, 2009). En réponse, ce facteur σ ECF va réguler plus de 300 gènes, impliqués dans des grandes fonctions comme l'homéostasie membranaire (Blanka et al., 2014; Boechat et al., 2013; Duchesne et al., 2013; Flécharde et al., 2018; Schulz et al., 2015), le biofilm (Blanka et al., 2014; Gicquel et al., 2013; Schulz et al., 2015), la virulence (Blanka et al., 2014; Gicquel et al., 2013; Schulz et al., 2015) ou encore la résistance aux antibiotiques (Brinkman et al., 1999; Gicquel et al., 2013).

Si les conditions d'activation et les fonctions régulées par SigX commencent à être bien décrites, la régulation transcriptionnelle de *sigX* l'est en revanche beaucoup moins. Il est décrit que SigX soit capable de s'autoréguler en partie (Bouffartigues et al., 2014, 2012). RpoD pourrait réguler *sigX*, et MvaT pourrait réprimer son expression. L'expression de *sigX* diminue chez des souches mutées des régulateurs AlgR, PqsR et Hfq (Chevalier et al., 2018). Enfin, AmrZ a été identifié comme pouvant se lier en amont du gène *sigX* chez *P. fluorescens* (Martínez-Granero et al., 2014).



trends in Microbiology

Figure 21. Représentation schématique d'un système à deux composants.

A. Système à deux composants classique. Après avoir reçu un stimulus, un senseur de réponse histidine kinase s'auto-phosphoryle sur un résidu histidine, puis transmet son phosphate au régulateur de réponse, qui pourra réguler les gènes sous sa dépendance. B. Système à deux composants non-orthodoxe. Le senseur histidine kinase possède cette fois 3 domaines. Après autophosphorylation de son résidu histidine, le phosphate est transmis eu deuxième puis au troisième domaine du senseur, avant d'être transmis au régulateur de réponse. C. Système à deux composants hybride. A la différence du système précédent, le troisième domaine du senseur est une protéine à part entière, qui va servir de phosphorelais pour le régulateur de réponse (**Rodrigue et al., 2000**).

De plus, une étude réalisée au sein du laboratoire, grâce à des délétions successives et fusions transcriptionnelles de la région en amont du gène *sigX* a montré l'existence d'au moins trois promoteurs. La région promotrice serait de 686 pb (**Données non publiées du LMSM**).

b. Systèmes à deux composants

i. Généralités

Comme mentionné au début de ce manuscrit, *P. aeruginosa* possède environ 9 % de protéines régulatrices prédites dans son génome, dont 64 senseurs histidines kinases et 72 régulateurs de réponses. Ce nombre considérable est une des causes de sa grande capacité d'adaptation, car elle peut ressentir un large panel de conditions environnementales et s'y adapter avec rapidité (**Gooderham et Hancock, 2009; Rodrigue et al., 2000; Stover et al., 2000**).

Un TCS est constitué d'un senseur situé dans la membrane interne ou, plus rarement, dans le cytoplasme, et d'un régulateur de réponse située dans le cytoplasme (**Figure 21, Rodrigue et al., 2000**). Ce système permet la transduction de signaux de l'extérieur de la cellule, du périplasme ou du cytoplasme jusqu'à l'adaptation à ces signaux par la régulation d'un certain panel de gènes.

Un système « classique » est constitué d'un senseur possédant un domaine histidine kinase, qui, sous l'action d'un stimulus, va s'autophosphoryler. Ce phosphate pourra ensuite être transmis au régulateur de réponse, qui s'activera alors et ira réguler les gènes sous sa dépendance (**Figure 21A**). Un TCS non-orthodoxe est composé de plusieurs domaines, avec un domaine receveur qui va recevoir le phosphate de l'histidine, et le transmettre à un troisième domaine. C'est ce dernier qui phosphorylera le régulateur de réponse (**Figure 21B**). Enfin, le dernier type de TCS est dit « hydride ». En effet, le fonctionnement est le même que pour le précédent, à la différence près que le troisième domaine n'appartient pas au senseur, mais est porté par une protéine intermédiaire servant de phosphorelais, le module Hpt, qui aura pour fonction de transmettre le phosphate au régulateur de réponse (**Figure 21C**). Trois protéines Hpt ont été identifiées chez *P. aeruginosa* : HptA, HptB (la mieux décrite) et HptC. Il est également possible que le régulateur de réponse, en l'état non-phosphorylé, puisse une activité de régulation, mais qui sera différente de l'état phosphorylé (**Francis et al., 2017; Gooderham et Hancock, 2009; Rodrigue et al., 2000**).

ii. TCS impliqués dans la réponse aux stress d'enveloppe

La réponse au stress d'enveloppe chez cette bactérie implique 12 TCS, répondants à divers stress liés à la présence d'antibiotiques et de métaux, notamment

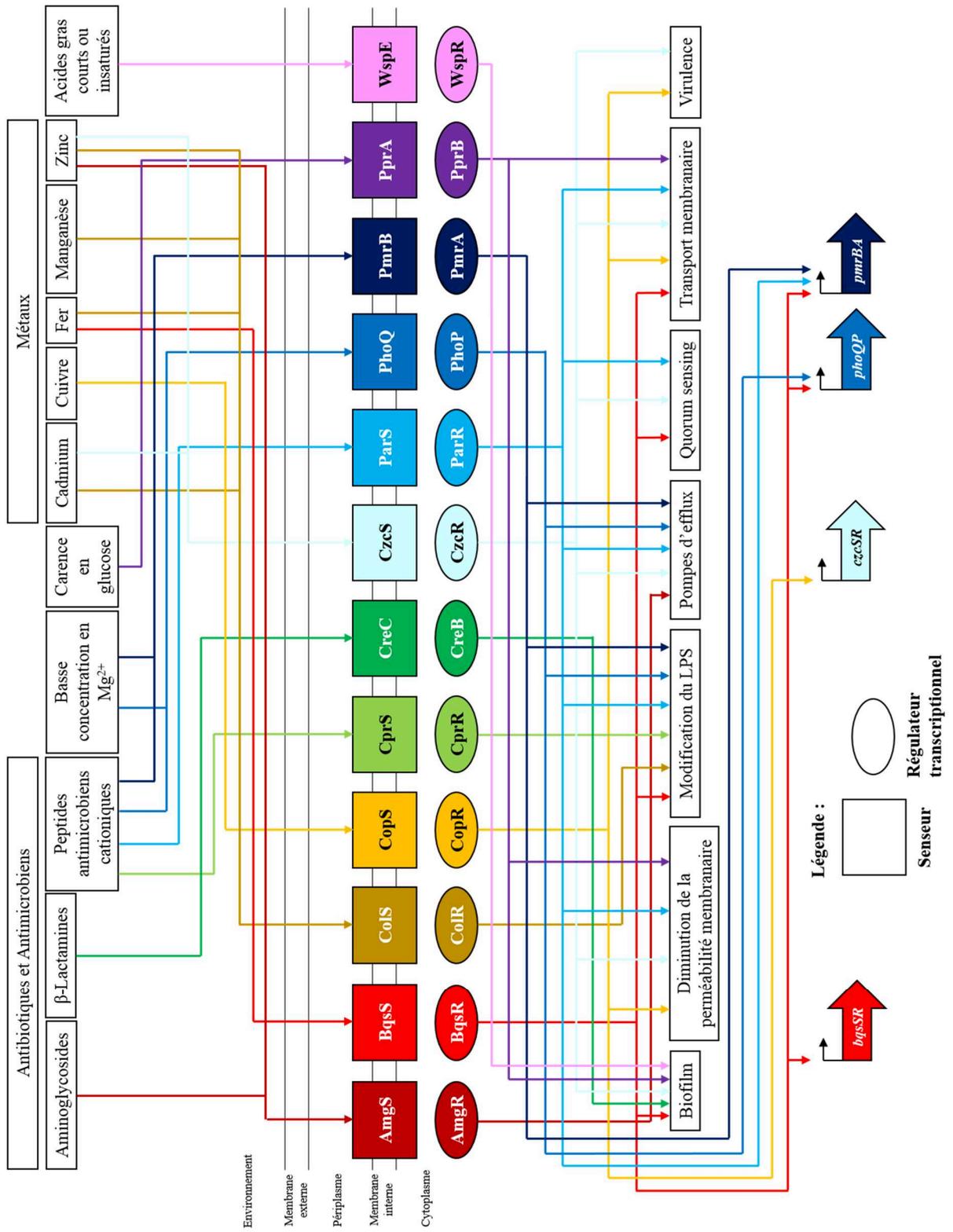


Figure 22. Systèmes à deux composants impliqués dans la réponse aux stress d'enveloppe chez *P. aeruginosa*.

Schéma récapitulatif de l'ensemble des conditions menant à un stress d'enveloppe, des TCS impliqués et de leur réponse physiologique (Ainsaar et al., 2014; Bernard et al., 2009; Blanka et al., 2015; Caille et al., 2007; de Bentzmann et al., 2012; Dieppois et al., 2012; Dong et al., 2008; Fernández et al., 2012, 2010; Gellatly et al., 2012; Giraud et al., 2011; Gooderham and Hancock, 2009; Gutu et al., 2013; Kremer et al., 2015, 2012; Lau et al., 2015; J.-H. Lee et al., 2014; J.-Y. Lee et al., 2014; Liu et al., 2017; Macfarlane et al., 2000, 1999; McPhee et al., 2006, 2003; Moskowitz et al., 2012; Muller et al., 2011; Perron et al., 2004; Poole et al., 2019, 2016; Teitzel et al., 2006; Wang et al., 2019, 2013, 2003; Zamorano et al., 2014).

(Gooderham et Hancock, 2009). La Figure 22 représente les stimuli activant ces TCS, ainsi que les fonctions régulées par eux, en réponse.

Le TCS AmgS-AmgR a été montré comme étant impliqué dans la réponse à la présence d'aminoglycosides, et très récemment, au zinc. Les aminoglycosides sont des antibiotiques ciblant le processus de traduction. *P. aeruginosa* possède un système d'efflux actif pour contrer ces antibiotiques : MexXY-OprM. L'action de ces antibiotiques provoque un mauvais repliement des protéines, qui vont s'insérer dans la membrane avec ce repliement aberrant. AmgS va le ressentir et activer AmgR. Ce dernier va activer 3 gènes, *hptX*, *yccA* et PA5528, dont les produits vont activer l'expression des gènes *mexX* et *mexY*. De plus, les aminoglycosides vont activer en parallèle l'expression d'*armZ*, dont la protéine va séquestrer MexZ, le répresseur naturel des gènes *mexX* et *mexY* lorsqu'il est sous forme libre. Il a également été montré que lorsqu'AmgR était activé, la cellule tolérait de plus fortes concentrations en zinc. Cependant, la pompe d'efflux MexXY-OprM ne semble pas impliquée dans ce processus. Le processus moléculaire reste donc à préciser (Lau et al., 2015; Poole et al., 2019, 2016).

BqsS-BqsR a déjà été évoqué précédemment comme étant impliqué dans la dispersion du biofilm, via l'augmentation de la C₄-HSL et de PQS. De plus, ce TCS est également capable de ressentir le fer ferreux soluble (Fe²⁺) via un domaine de liaison situé sur le senseur BqsS. BqsR va ainsi, une fois activé, pouvoir s'autoréguler d'une part, puis réguler les TCS PhoQ-PhoP et PmrB-PmrA et les gènes impliqués dans le transport de la spermidine, une polyamine impliquée

dans la stabilisation du LPS et la séquestration des peptides antimicrobiens cationiques (**Dong et al., 2008; Kreamer et al., 2015, 2012**).

Le TCS ColS-ColR est activé, chez *P. putida*, en réponse à de fortes concentrations en cadmium, fer, manganèse et zinc. Il est supposé qu'il en soit de même chez *P. aeruginosa*, au vu des fortes homologies de séquences des gènes du TCS entre les deux espèces, mais aussi au vu de la conservation de ce TCS chez toutes les espèces du genre *Pseudomonas*. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la présence d'un TCS ColS-ColR fonctionnel était nécessaire à l'acquisition d'une mutation du gène *phoQ*, observée chez les souches cliniques résistantes aux polymyxines. Cependant, l'explication moléculaire de ce phénomène reste à décrire (**Ainsaar et al., 2014; Gutu et al., 2013**).

La réponse au cuivre implique le TCS CopS-CopR. Une population adaptée au cuivre montre une augmentation de la pyoverdine, une diminution de la pyochéline et de plusieurs porines, dont OprD, impliquée dans la résistance aux carbapénèmes, entraînant une diminution de la perméabilité membranaire. De plus, CopR peut activer la transcription des gènes codant pour le TCS *czcS-czcR*, qui sera détaillé ci-après (**Caille et al., 2007; Teitzel et al., 2006**).

Le TCS CprS-CprR est impliqué dans la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques, via l'action de l'opéron *arnBCDATEF*, qui permet la modification du LPS. De plus, comme ColS-ColR, la présence d'un TCS CprS-CprR fonctionnel est nécessaire à l'acquisition de la mutation du gène *phoQ* permettant la résistance constitutive des souches cliniques aux polymyxines (**Fernández et al., 2012; Gutu et al., 2013; J.-Y. Lee et al., 2014**).

CreB-CreC est un TCS impliqué dans la réponse aux β -lactamines, en parallèle de la réponse liée à AmpR et AmpC. Plus précisément, ce TCS répond à l'inhibition des PLP4. En réponse, ce régulateur contrôle l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la dénitrification et le transport des nitrites et des nitrates. Il est également à noter que ce système est impliqué dans la formation de biofilm (**Zamorano et al., 2014**).

Le TCS CzcS-CzcR est activé principalement en réponse au zinc, et mineuremment au cadmium. Il est responsable de la diminution d'OprD, et est impliqué dans la formation de biofilm. Il peut également moduler la virulence via la régulation de *phzA1*, gène impliqué dans la production des phénazines dont la pyocyanine, mais aussi la régulation de la production de la pyochéline. Ce système pourrait également moduler le QS, mettant en lien les phénotypes précédents. De plus, il est impliqué dans la production d'une pompe d'efflux, CzcCBA, servant

à expulser le zinc (Caille et al., 2007; Dieppois et al., 2012; J.-H. Lee et al., 2014; Perron et al., 2004).

Le système ParS-ParR est un TCS très important dans la résistance aux aminoglycosides, fluoroquinolones, β -lactamines, et peptides antimicrobiens. En réponse à une exposition aux peptides antimicrobiens cationiques, ce TCS induit l'expression de deux pompes d'efflux, MexXY-OprM, impliquée dans la résistance aux aminoglycosides, et MexEF-OprN, dans la résistance aux quinolones, au chloramphénicol et au triméthoprime, ainsi qu'aux solvants et certains biocides. De plus, ce TCS est capable d'induire l'opéron *arnBCADTEF* permettant la modification du LPS, et du TCS PmrB-PmrA qui sera décrit ci-après. Enfin, il intervient dans la réduction de la perméabilité membranaire et la résistance aux carbapénèmes via la répression de la porine OprD (Fernández et al., 2010; J.-Y. Lee et al., 2014; Muller et al., 2011; Wang et al., 2013).

Le TCS PhoP-PhoQ est activé en présence de peptides antimicrobiens cationiques ou lors de faibles concentrations en Mg^{2+} , dont le rôle est important pour stabiliser la membrane externe. Il est également activé lors d'un contact entre la bactérie et des cellules eucaryotes. Il est impliqué dans la résistance à ces peptides antimicrobiens cationiques par modification du LPS via l'opéron *arnBCADTEF*, et peut également réguler un opéron codant un transporteur ABC impliqué dans le rejet de la tétracycline. Il est à noter qu'il peut également s'autoréguler (Gellatly et al., 2012; J.-Y. Lee et al., 2014; Macfarlane et al., 2000, 1999; McPhee et al., 2006).

Le TCS PmrB-PmrA, à l'instar de PhoQ-PhoP, est activé en présence de faibles concentrations en Mg^{2+} , ou lors de l'exposition de la bactérie aux peptides antimicrobiens cationiques. Il peut modifier le LPS via l'activation de l'opéron *arnBCADTEF*, régule l'opéron *feoAB* impliqué dans le transport du Fe^{2+} , et active l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans le transport des ions Mg^{2+} . Il peut également s'autoréguler, et être régulé par ParS-ParR, comme mentionné précédemment. Enfin, il a récemment été décrit que ce système était impliqué dans l'expression de *lipA* via la régulation de l'expression de *rsmY* (J.-Y. Lee et al., 2014; Liu et al., 2017; McPhee et al., 2006, 2003; Moskowitz et al., 2012).

Le TCS PprA-PprB pourrait être activé dans des conditions de carence en glucose (Wang et al., 2019). Ce TCS intervient dans la régulation de la perméabilité membranaire via notamment la régulation d'OprF, ainsi que dans l'expression des fimbriae via la voie chaperonne *cup*, des

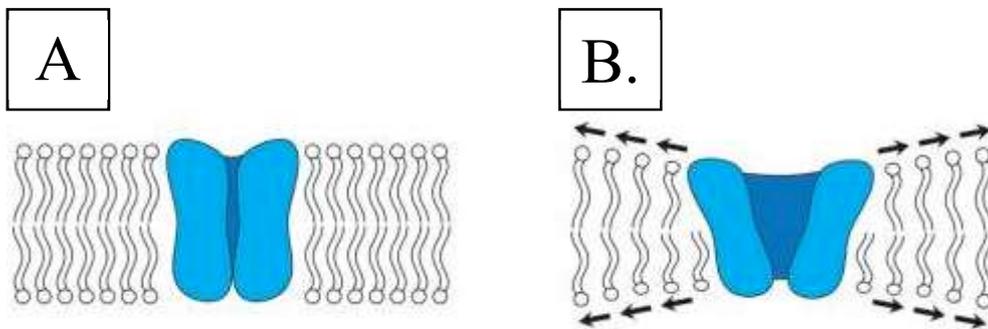


Figure 23. Conformations d'un canal mécanosensible.

A. Configuration fermée du canal : absence de tensions mécaniques sur la membrane. B. Configuration ouverte du canal : tensions mécaniques sur la membrane, entraînant un changement de conformation de la membrane et, par extension, du canal (Wilson et al., 2013).

pili de type IV via la régulation du locus *tad*, et dans la régulation du système d'adhésion Bap (Bernard et al., 2009; de Bentzmann et al., 2012; Giraud et al., 2011; Wang et al., 2003).

Enfin, le dernier système est plus atypique. Ce système implique le TCS WspE-WspR, mais est relié à d'autres protéines, dont notamment WspA situé dans la membrane externe et permettant de ressentir le contact avec la surface, et WspBD liant WspA à WspR. WspR est un régulateur particulier, puisque c'est une diguanylate cyclase, permettant ainsi la production de c-di-GMP. Il a été décrit que ce système pourrait être activé en réponse à une diminution d'AccB et AccC, conduisant à une diminution des chaînes des AG, ainsi qu'à de fortes concentrations en sels. La réponse serait alors l'augmentation du taux intracellulaire de c-di-GMP et ainsi d'orienter la bactérie vers un phénotype biofilm (Blanka et al., 2015).

c. Canaux mécanosensibles

De la bactérie au plus évolué des animaux, tous les organismes vivants peuvent ressentir les forces mécaniques. Pour l'ensemble du vivant, les canaux mécanosensibles sont le moyen de ressentir et s'adapter à ces forces sans que ce ne soit délétère pour leurs cellules. Etant donné que l'activation de ces canaux amène à une réponse adaptative chez la cellule, ces canaux sont aussi appelés canaux mécanotransducteurs. Chez les bactéries à Gram négatif, ces canaux sont situés dans la membrane interne. Sous l'effet d'une force mécanique, une déformation de la membrane peut se produire, et entraîner ainsi un changement de la conformation du canal (les hélices transmembranaires hydrophobes interagissant avec les phospholipides environnants), le faisant passer d'une conformation fermée (**Figure 23A**) à une conformation ouverte (**Figure 23B**; Wilson et al., 2013). La plupart des études effectuées jusqu'alors sont des études structurales et biochimiques. Quelques études mentionnent cependant que ces canaux sont régulés par RpoS, positivement ou négativement (Schellhorn et al., 1998; Schumann et al., 2010; Stokes et al., 2003; Wilson et al., 2013); d'autres études tendent à montrer un lien entre les homologues du facteur σ ECF de réponse au stress d'enveloppe RpoE et l'expression de certains canaux, chez *Salmonella*, chez *Synechocystis* sp.PCC6803 et chez *P. aeruginosa* (Amar et al., 2018; Osanai et al., 2005; Wilson et al., 2013; Wood et Ohman, 2009). Enfin, un lien a été documenté entre l'interaction d'un canal mécanosensible (PamA), présent chez *Synechocystis* sp.PCC6803, et un senseur d'azote et de carbone (PII) hautement conservé. L'interaction entre ces deux protéines modifie l'expression des gènes relatifs à l'incorporation de l'azote et du carbone chez cette cyanobactérie. L'absence de PamA conduit à une diminution de l'expression de ces gènes, suggérant que l'azote et le carbone pourraient être incorporés dans

certaines conditions osmotiques et modifier le métabolisme de cette bactérie en réponse à ces conditions (**Osanai et al., 2005; Osanai et Tanaka, 2007; Wilson et al., 2013**).

Concernant l'impact de ces canaux sur la physiologie de la bactérie, quelques études ont montré qu'il existait un lien entre ces canaux mécanosensibles et la division cellulaire, que ce soit chez les plantes ou chez les bactéries. En effet, il a été montré que des mutants de certains canaux mécanosensibles entraînaient une division cellulaire anormale de la cellule (**Wilson et al., 2013, 2011; Wilson et Haswell, 2012**). Il a également été montré que deux canaux de *Campylobacter jejuni* sont impliqués dans la colonisation de l'hôte lors de l'infection (**Kakuda et al., 2012**). Cependant, la majorité des études se concentre sur la fonction majeure de ces canaux : le maintien de l'intégrité de la bactérie lors de chocs hypo-osmotiques. En effet, sous l'influence de changements de la tension membranaire dus à une variation de la pression osmotique, ces canaux vont s'ouvrir et diffuser des osmolytes, contrebalançant les effets du choc osmotique et empêchant ainsi une pression de turgescence trop forte et une lyse cellulaire. Pour cela, la bactérie réagit de façon proportionnelle à la tension ressentie, via l'ouverture de canaux structurellement différents. En effet, deux grandes familles de canaux mécanosensibles existent, MscL (Large conductance) et MscS (Small conductance). Si les MscS s'ouvrent lors de faibles déformations membranaires, les MscL eux ne s'ouvrent que lorsque de grandes forces mécaniques mettent en péril l'intégrité de la cellule. En effet, les MscS possèdent des pores relativement petits (environ 16Å de diamètre), ne laissant diffuser que certains ions tels que les ions potassium K^+ . Les MscL, en revanche, possèdent des pores beaucoup plus grands (environ 30Å de diamètre), et permettent la diffusion de tout composé de masse inférieure à environ 1000 Da, jouant ainsi le rôle de « valve » d'urgence pour éviter la lyse cellulaire. Cette réponse est extrêmement rapide, et bien caractérisée. Après un choc hypo-osmotique, le gonflement des cellules est observé en 30 à 50 ms, et l'ouverture des canaux mécanosensibles se produit environ 150 à 200 ms après le choc, les premières lyses bactériennes étant observées à environ 1 s. Néanmoins, une proportion d'environ 90% de cellules survivantes est notée, alors qu'une cellule délestée de ses canaux mécanosensibles exhibe une chance de survie d'environ 10% (**Booth, 2014; Booth et Blount, 2012; Haswell et al., 2011; Kung et al., 2010; Naismith et Booth, 2012; Pivetti et al., 2003; Wilson et al., 2013**). La description de ces deux familles de canaux ayant été réalisée principalement chez *E. coli*, les deux prochains paragraphes traitant de ces canaux seront une description chez cette bactérie uniquement. Les canaux mécanosensibles chez *P. aeruginosa* seront abordés dans un troisième paragraphe.

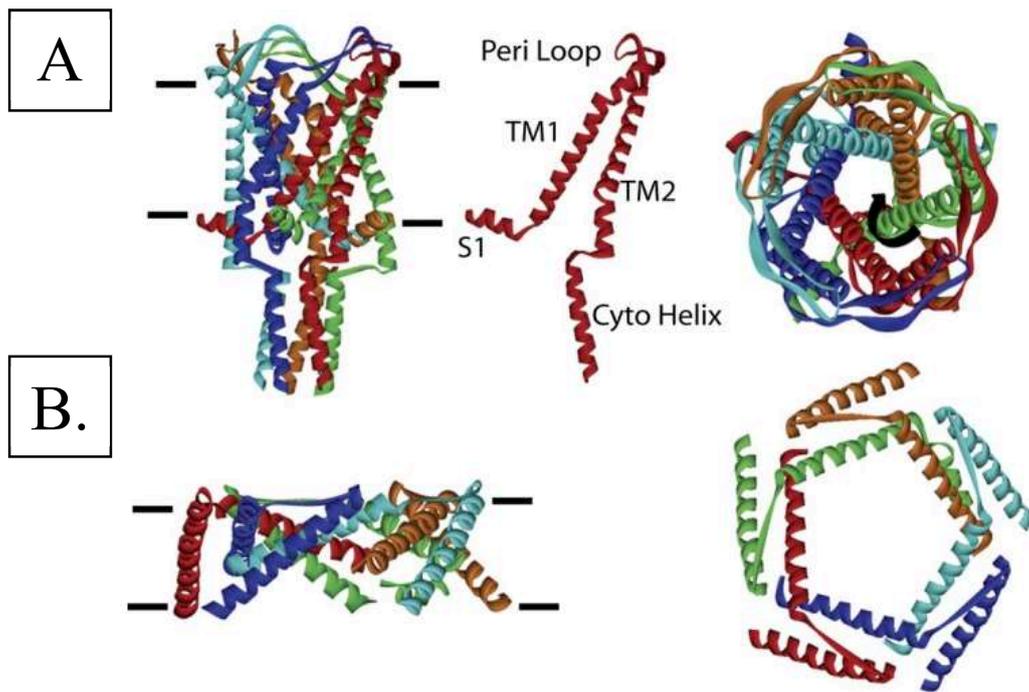


Figure 24. Structure modélisée de MscL d'*E. coli*.

A. Structure de MscL en conformation « canal fermé » (vue de face et du dessus), et structure d'un seul monomère MscL (au centre). B. Structure de MscL en conformation « canal ouvert », sous l'influence d'une tension membranaire. Les hélices transmembranaires « s'écrasent » avec la membrane, permettant l'ouverture du canal tel un obturateur d'appareil photographique (**Booth et Blount, 2012**).

i. MscL

Les monomères de ce canal sont codés par le gène *mscL* chez *E. coli*, qui n'est présent qu'en une seule copie, comme chez l'ensemble des bactéries chez lesquelles ce gène est présent. MscL est hautement conservé entre bactéries. Il est composé d'une hélice α N-terminale située dans le cytoplasme, d'une hélice transmembranaire TM1, d'une boucle périplasmique, d'une deuxième hélice transmembranaire TM2 et d'une dernière hélice α C-terminale située dans le cytoplasme (**Figure 24**). Les variations observées des orthologues de ce gène sont limitées et concernent la longueur de l'hélice α N-terminale ou C-terminale, et la longueur de la boucle périplasmique ; ces différences n'étant de l'ordre que de quelques acides aminés. Le canal MscL est composé d'un pentamère de ces sous-unités chez *E. coli* (**Figure 24A**). Lors d'une forte tension membranaire, le canal s'ouvre et permet le passage des composés de masse inférieure à 1000 Da, sans sélectivité (**Figure 24B**). C'est pour cette raison qu'il a été suggéré que ce canal était très important lors de conditions de chocs hypo-osmotiques extrêmes pour la bactérie, formant une « valve » de sécurité permettant d'éviter la lyse par un relargage massif d'osmolytes (ions, eau, peptides et petites protéines...). La bactérie doit donc, en dehors de ces conditions extrêmes, laisser ce « système de la dernière chance » fermé, sous peine d'effets délétères très rapides (**Booth, 2014; Booth et Blount, 2012; Haswell et al., 2011; Iscla et Blount, 2012; Kung et al., 2010; Pivetti et al., 2003**).

ii. MscS

Contrairement à MscL, la famille des canaux de type MscS est vaste et comprend beaucoup de membres, tous très différents entre eux. Il est également courant de retrouver plusieurs canaux différents de la famille MscS codés dans les génomes bactériens. Initialement, le canal MscS a été décrit comme étant formé d'un heptamère, dont les monomères sont codés par le gène *mscS*. Ce monomère est composé de deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2), puis d'une troisième hélice, séparée en deux domaines, TM3A qui est insérée dans la membrane, et TM3B qui est une hélice parallèle à la membrane cytoplasmique. Cette dernière est reliée au domaine β (aussi nommé domaine vestibulaire), lui-même relié au domaine $\alpha\beta$ (**Figure 25A**). Sous forme d'heptamère, le canal possède des portails latéraux entre les domaines β et $\alpha\beta$, ce qui permet l'entrée des ions et solutés afin qu'ils puissent être rejetés par le pore du canal (**Figure 25B**). Les domaines spécifiques retrouvés sur l'ensemble des membres de cette famille sont les trois hélices et le domaine β (**Figure 25C**). Lorsqu'une tension membranaire apparaît, la conformation du monomère change, les hélices TM1 et TM2 s'écrasent, conduisant l'hélice TM3A à devenir perpendiculaire à la membrane, formant un angle plus fermé avec l'hélice TM3B, et permettant l'ouverture du pore (**Figure 25D**). Ce changement de conformation est

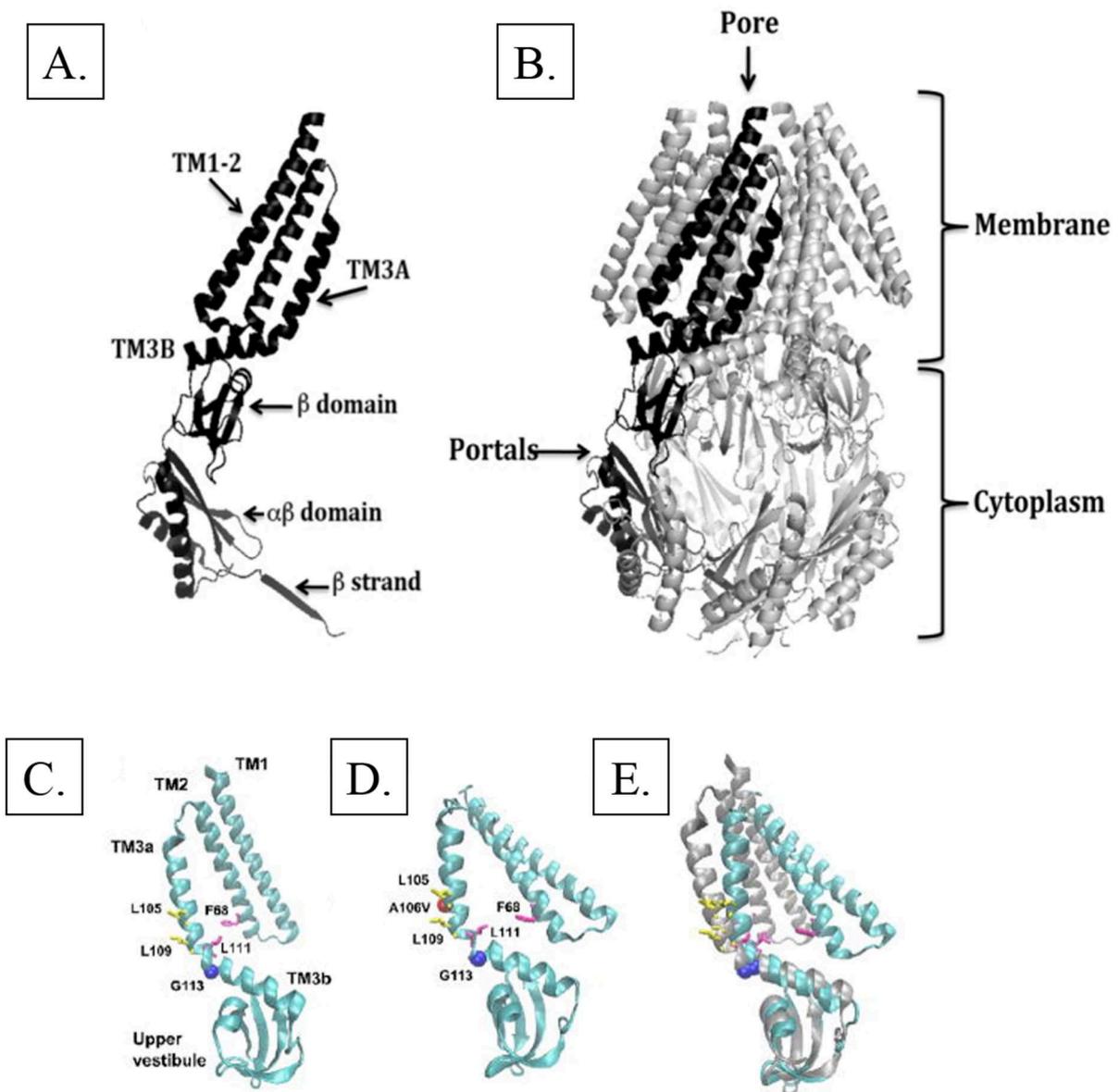


Figure 25. Structure modélisée de MscS d'*E. coli*.

A. Structure du monomère de MscS en conformation fermée. B. Structure du canal MscS, formé par un homoheptamère de MscS. Les ions et solutés entrent au niveau du portail formé entre les domaines β et $\alpha\beta$. C. Domaine conservé chez les autres membres de la famille des MscS, en configuration fermée. D. Domaine conservé, en conformation ouverte. E. Superposition du domaine conservé en conformation fermée (en gris) et ouverte (en bleu) (A et B : **Booth et Blount, 2012** ; C, D et E : **Wilson et al., 2013**).

bien visible lorsque les deux monomères sont superposés (**Figure 25E** ; **Booth et Blount, 2012**; **Haswell et al., 2011**; **Kung et al., 2010**; **Naismith et Booth, 2012**; **Pivetti et al., 2003**; **Wilson et al., 2013**).

La **Figure 26** représente 5 exemples de canaux de la famille des MscS retrouvés chez *E. coli* (MscS et MscK), *Corynebacterium glutamicum* (MscCG), et chez la plante *Arabidopsis thaliana* (MSL2 et MSL10). Le domaine conservé, présenté précédemment, est représenté en noir. Il est aisé de constater que ces canaux varient beaucoup entre eux, tant au niveau du nombre de domaines transmembranaires, que des domaines périplasmiques et cytoplasmiques. La raison de ces variations n'est pas connue ; toutefois, il est désormais admis que chaque canal possède ses propres spécificités physiologiques, bien que sa fonction globale reste la même, à savoir la protection contre les chocs osmotiques. De plus, il a été suggéré que les domaines supplémentaires présents dans certains canaux pourraient leur conférer des rôles additionnels, comme des rôles de senseur grâce aux larges domaines périplasmiques présents, qui pourraient interagir avec d'autres protéines ou structures bactériennes. Cela démontre que ces canaux, bien qu'ayant à la base la même fonction de protection contre les chocs osmotiques, se sont diversifiés et spécialisés au cours de l'évolution, permettant à la bactérie de s'adapter plus finement aux conditions environnementales (**Wilson et al., 2013**).

Chez *E. coli*, en plus de MscL, 6 canaux appartiennent à la famille des MscS : MscS, MscK, YbdG, YbiO, YjeP, et YnaI. Ils ne possèdent que 20 à 30 % d'identité et environ 60 à 65 % de similarité à MscS. Bien que chaque canal possède un rôle dans la régulation de la pression osmotique, leur fonction n'est requise pour la viabilité cellulaire que sous certaines conditions environnementales. Tout d'abord, il est intéressant de noter que chaque canal ne s'ouvre qu'à certains seuils de pression osmotique, YnaI étant le plus sensible puis YjeP, YbdG, YbiO, MscK, MscS et enfin MscL, qui ne s'ouvre qu'à des pressions osmotiques extrêmes (**Edwards et al., 2012**; **Schumann et al., 2010**; **Wilson et al., 2013**). YbiO a été décrit pour être activé en présence de fortes concentrations en NaCl dans l'environnement (**Edwards et al., 2012**), par exemple, alors que MscK a été décrit comme étant actif dans des environnements ayant de fortes concentrations en ions potassium K⁺ (**McLaggan et al., 2002**; **Wilson et al., 2013**). De plus, chaque canal ne rejette qu'un type spécifique d'ion (**Wilson et al., 2013**).

RpoS a été décrit comme régulant positivement les gènes codant les canaux MscL, MscS et YbiO, et négativement le gène codant le canal YbdG (**Edwards et al., 2012**; **Schumann et al., 2010**; **Stokes et al., 2003**; **Wilson et al., 2013**). EvgA, un régulateur de l'expression des gènes répondant aux stress acides, contrôle l'expression de YnaI (**Masuda et Church, 2002, 2003**).

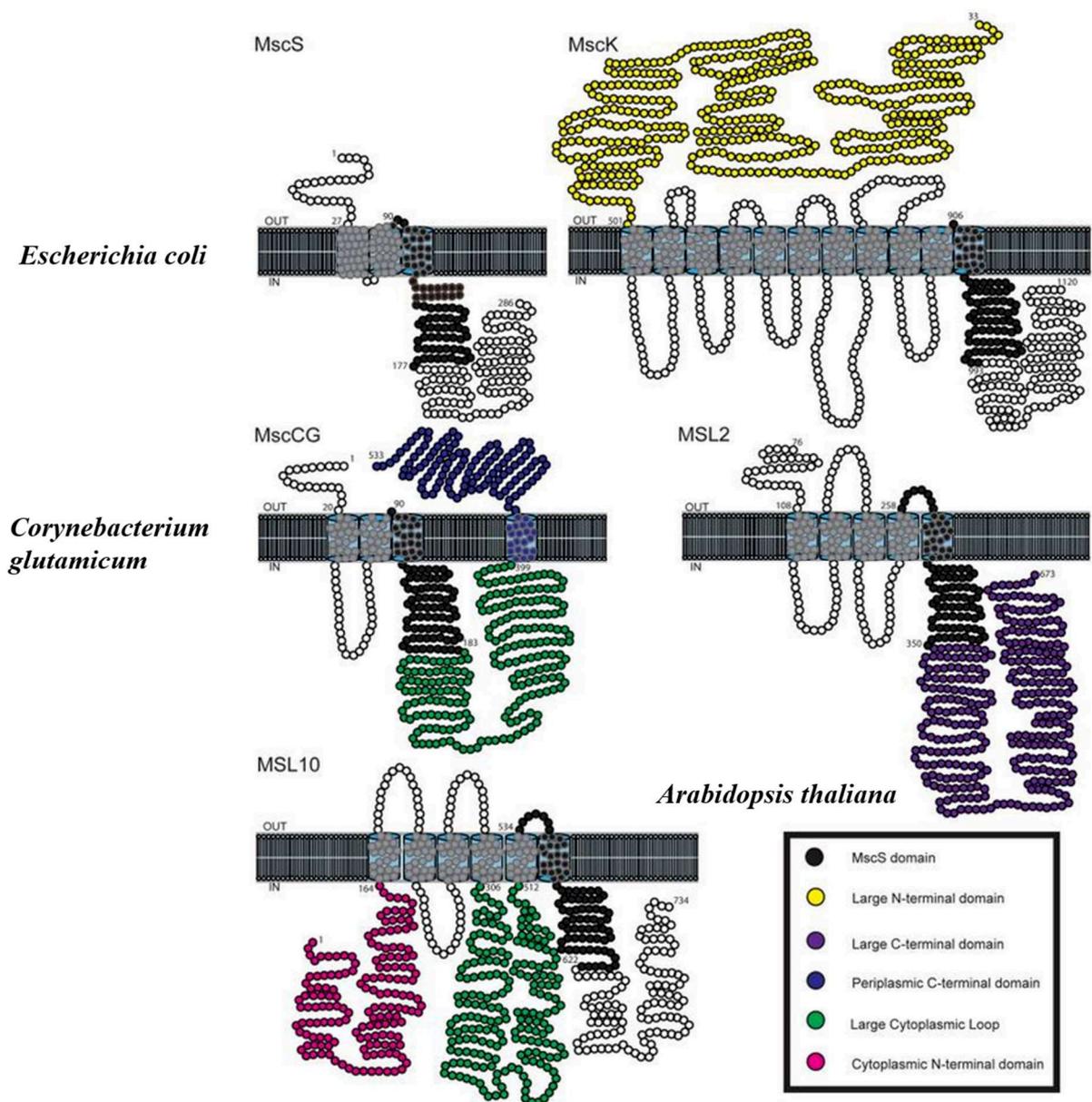


Figure 26. Structure et insertion membranaire des domaines de différents canaux de type MscS.

Les canaux de la famille MscS possèdent des structures variées en termes de nombre et taille des domaines transmembranaires et des boucles périplasmiques et cytoplasmiques. Le domaine en noir représente le domaine conservé entre tous les canaux de la famille des MscS. « OUT » représente l'espace périplasmique, « IN » le domaine cytoplasmique (Wilson et al., 2013).

YjeP, dont le gène se situe dans un opéron avec le gène *psd* codant pour la phosphatidylsérine décarboxylase permettant la genèse de la phosphatidyléthanolamine, est régulé avec *psd* par RpoE et le TCS CpxA-CpxR, qui sont des régulateurs de réponse aux stress extracytoplasmiques chez *E. coli* (De Wulf et al., 2002; Rezuchova et al., 2003). Ces données de régulation suggèrent, comme évoqué précédemment, que ces canaux ont des fonctions physiologiques différentes, et que la bactérie adapte l'expression de leurs gènes en fonction du stress subi.

iii. Canaux mécanosensibles chez *P. aeruginosa*

Au contraire d'*E. coli*, les canaux mécanosensibles de *P. aeruginosa* n'ont pratiquement jamais été décrits en tant que tel. Il existe 9 canaux mécanosensibles prédits sur le génome de *P. aeruginosa* PAO1, 1 MscL et 8 appartenant à la famille des MscS (www.pseudomonas.com ; **Tableau 4 ; Pivetti et al., 2003**). L'étude de Pivetti et collaborateurs a permis de mettre en lumière les homologies de séquences entre les MscS de différentes espèces. Ces auteurs ont ainsi pu générer un arbre phylogénétique de l'ensemble de ces MscS dont les séquences étaient disponibles à l'époque (**Figure 27**). Ils en ont déduit que les MscS présents chez les espèces ne provenaient pas de transferts génétiques horizontaux récents, mais plutôt d'une longue évolution espèce-dépendante de ces canaux. Des groupes phylogénétiques de ces canaux ont pu être mis en lumière, et expliquent certaines homologies fonctionnelles retrouvées entre canaux chez différentes espèces (**Pivetti et al., 2003**). Grâce à cette analyse phylogénétique, couplée à une analyse génique et une analyse des structures secondaires des gènes codant ces canaux de *P. aeruginosa*, il est possible d'en associer 6 à leurs homologues chez *E. coli* : PA1408 pourrait être l'homologue de *yjeP*, PA3468 celui de *ybdG*, PA4394 celui de *mcsS*, PA5022 celui de *mcsK*, PA5121 celui de *ybiO* et PA4614 est lui d'ores-et-déjà décrit comme étant l'homologue de *mcsL*. Il est à préciser tout de même que PA1408 et *yjeP* ont une différence notable dans la longueur de leurs gènes. Cependant, leur origine phylogénétique semble commune, et ils possèdent tous deux 11 domaines transmembranaires, suivis d'un domaine cytoplasmique, plus court chez PA1408, suggérant une homologie putative entre ces deux canaux (**Tableau 4, Figure 27**). Concernant les trois autres canaux mécanosensibles prédits, ils ne semblent pas avoir d'homologues chez *E. coli*. PA1775 (*cmpX*) est très conservé chez le genre *Pseudomonas* (www.pseudomonas.com), mais éloigné phylogénétiquement d'autres canaux mécanosensibles, les plus proches étant des canaux de *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis* et d'une archée, *Aeropyrum pernix*. PA4925 semble avoir évolué à partir de canaux présents chez *Burkholderia mallei* et *pseudomallei* (**Pivetti et al., 2003**). Il est intéressant de noter que

Tableau 4. Canaux mécanosensibles chez *P. aeruginosa*, et leurs homologues chez *E. coli*.

Nombre PA (Nom du gène)	Longueur du gène (pb)	Homologue chez <i>E. coli</i> (longueur du gène en pb)	Nom donné par Pivetti et al., 2003
PA1408	2424	YjeP (3324)	Pae4
PA1775 (<i>cmpX</i>)	825		Pae7
PA3468	1329	YbdG (1248)	Pae6
PA4394	837	MscS (861)	Pae2
PA4614 (<i>mscL</i>)	414	MscL (411)	Pae
PA4925	852		Pae3
PA5022	3357	MscK (3363)	Pae1
PA5121	2208	YbiO (2226)	Pae5
PA5251	579		Pae8

ces deux espèces sont des pathogènes responsables d'infections respiratoires graves chez l'Homme, et qu'un autre groupe d'espèces, le complexe *Burkholderia cepacia* regroupant 22 espèces apparentées, est un ensemble de pathogènes opportunistes fréquemment retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose, à l'instar de *P. aeruginosa* (Scoffone et al., 2017). Des homologues de PA4925 sont d'ailleurs retrouvés sur les espèces appartenant au genre *Burkholderia*. Un transfert latéral de ce gène pourrait donc être à l'origine de la présence du PA4925 sur le génome de *P. aeruginosa* et qui aurait évolué avec la bactérie. PA5251 semble être atypique et propre aux *Pseudomonas*, ne présentant pas de similarités proches avec des canaux d'autres espèces (Pivetti et al., 2003). Il est situé dans un opéron avec un gène codant un composant d'un transporteur ABC, suggérant un lien fonctionnel avec ce type de transporteurs, ce cas n'ayant jamais été décrit chez d'autres espèces (www.pseudomonas.com).

Comme évoqué précédemment, les canaux mécanosensibles de *P. aeruginosa* ont rarement été l'objet central d'études. Cependant, ils apparaissent dans différentes études transcriptomiques et protéomiques, suggérant une implication de ces canaux dans la physiologie de la cellule bien plus importante et vaste que celle décrite jusqu'à maintenant chez *E. coli*. Plusieurs études concernent CmpX, qui seront abordées dans le paragraphe qui concernera ce canal mécanosensible particulier. Comme pour *E. coli*, RpoS régule l'expression de gènes codant certains canaux, *mscL*, PA5022 et PA4925 chez *P. aeruginosa* (Schuster et al., 2004). De même, PA4925 peut être régulé par PsrA, un régulateur transcriptionnel important impliqué dans une multitude de fonctions telles que la régulation de l'expression de *rpoS*, des PQS ou encore du système de sécrétion de type III (Kang et al., 2008), et du système Las (Schuster et al., 2003).

Lors de conditions stressantes, l'expression des gènes des canaux peut être modifiée. Ainsi, il a été décrit qu'AlgU, l'homologue de RpoE chez *P. aeruginosa* (voir sa description dans la partie facteur σ ECF), régule les gènes *mscL* et PA4394 (Wood et Ohman, 2012, 2009). Lors d'un traitement par des conditions sub-inhibitrices de ciprofloxacine, un antibiotique de la famille des quinolones ciblant la gyrase bactérienne, il a été montré que PA4925, PA5251 et PA5020 étaient induits (Brazas et Hancock, 2005). Le gène PA4614 a été montré comme étant induit par la présence d'indole (Lee et al., 2009), et l'expression du gène PA5121 est diminuée lors d'un traitement par des nanoparticules d'argent (Singh et al., 2019). L'abondance de la protéine PA1408 est diminuée lors d'un traitement par un composé isothiocyanate, l'ibérine (Tan et al., 2014). MscL a également été montré comme étant impliqué dans l'homéostasie du

calcium. Ce dernier a été montré comme étant impliqué dans la régulation de transporteurs RND, contribuant à la résistance à la tobramycine. Il existe donc un lien entre ces canaux mécanosensibles et la résistance à la tobramycine (**Guragain et al., 2013; Khanam et al., 2017**).

Plusieurs canaux sont également impliqués dans la virulence, puisque sur modèle laitue, l'expression de *mscL* diminue, alors que celle de PA4925 augmente. Sur modèle de peau brûlée chez la souris, l'expression de PA4925 diminue (**Bielecki et al., 2011**). Une étude a révélé qu'un mutant de PA4394 ou de PA5251 conduit à une forte diminution de la formation de biofilm. Un mutant de PA4394 conduit également à une forte diminution de la virulence en modèle drosophile et poumon de souris, tandis qu'un mutant de PA5251 conduit seulement à une légère diminution de la virulence en modèle poumon de souris (**Heacock-Kang et al., 2017**).

Enfin, une étude a été réalisée sur PA5022. Un mutant de ce gène induit une abolition de la mobilité de type « swimming », une augmentation de la formation de biofilm, et une diminution de l'expression et de l'activité de l'élastase B, due à une implication du PA5022 dans la régulation de l'expression des gènes *lasI* et *rhII* ainsi qu'à des régulateurs du QS tels que *vqsR* ou *rpoN* (**Tableau 1**), par un moyen qui demeure non élucidé (**Li et al., 2015**).

Outre leurs fonctions de protection face aux chocs hypo-osmotiques, les canaux mécanosensibles sont donc impliqués dans une multitude de fonctions physiologiques, telles que la réponse aux stress, la virulence, la formation de biofilm ou encore la division cellulaire.

d. Environnement génomique de *sigX*

Le gène *sigX* possède un environnement génomique particulier et conservé chez l'ensemble des membres du genre *Pseudomonas*. En amont de ce gène, se trouve un opéron de 3 gènes, *cmaX*, *cfrX* et *cmpX*, et en aval, *oprF* (**Figure 20**).

i. *CmaX*

Cette protéine est très peu décrite dans la littérature. Elle possède un domaine conservé appartenant à la famille des transporteurs CorA/ZntB, qui sont des transporteurs de Mg^{2+} et de zinc, respectivement (**Niegowski et Eshaghi, 2007**). Une étude a montré que son gène était entièrement conservé chez le genre *Pseudomonas*, mais qu'aucun orthologue n'était retrouvé en dehors de ce genre (**Dötsch et al., 2010**). De plus, l'expression de ce gène est induite lors de la réponse à une exposition à la D-cyclosérine médiée par AlgU (**Wood et Ohman, 2009**). Ce

gène a été initialement décrit comme étant le premier gène de l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* putatif. Or, les données disponibles d'expression des gènes montrent une différence de réponse entre *cmaX* et *cfrX-cmpX* dans les conditions activant ces gènes. Notamment, le transcriptome réalisé par Gicquel et collaborateurs a montré une diminution de l'expression de *cfrX-cmpX* chez un mutant $\Delta sigX$, tandis que l'expression de *cmaX* n'était pas affectée (Gicquel et al., 2013). Il est donc suspecté que *cmaX* forme une unité monocistronique, et que *cfrX-cmpX* forment un opéron.

ii. *CfrX*

CfrX est une protéine conservée chez le genre *Pseudomonas*. L'étude de Staroń et collaborateurs suggère que CfrX serait un facteur anti- σ (Staroń et al., 2009). Les gènes des facteurs σ ECF et anti- σ étant souvent proches dans l'organisation génomique, il est tentant de spéculer que CfrX pourrait être le facteur anti- σ de SigX. De plus, comme précisé dans le paragraphe précédent, SigX est capable de moduler l'expression de *cfrX*, révélatrice de liens fonctionnels proches (Gicquel et al., 2013). Il a également été montré que l'expression de *cfrX* est induite en conditions sub-inhibitrices de ciprofloxacine (Brazas et Hancock, 2005).

iii. *CmpX*

Comme indiqué dans la partie consacrée aux canaux mécanosensibles, CmpX ferait parti de cette famille des canaux MscS. Il semble très particulier, car il ne possède pas d'homologie en dehors du genre *Pseudomonas*, comme CfrX. Ce canal mécanosensible a fait l'objet de quelques études, suggérant son implication dans la virulence, la formation de biofilm et la mobilité. Ainsi, il a été montré que l'expression de *cmpX* augmentait sur modèles laitue et peau brûlée de souris (Bielecki et al., 2011). Un mutant par transposition de *cmpX* active fortement l'expression de PA1611 (Kong et al., 2013), dont le produit est impliqué dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile via l'interaction entre PA1611 et RetS (Figure 7). Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié un mutant de délétion $\Delta cmpX$ et mis en évidence une implication du canal mécanosensible et la virulence, la formation de biofilm et la mobilité. Ce mutant présente une augmentation du taux de c-di-GMP ainsi que de l'expression de WspR, et une diminution de la transcription d'*oprF* et *sigX* (Bhagirath et al., 2018). Ces auteurs ont également noté une diminution de la résistance à la tobramycine, également observée dans une précédente étude, suggérant une implication de cette protéine dans la résistance à la tobramycine chez *P. aeruginosa* (Bhagirath et al., 2018; Gallagher et al., 2011).

Enfin, SigX régule l'expression de *cmpX* (**Blanka et al., 2014; Bouffartigues et al., 2012; Gicquel et al., 2013**). Un mutant $\Delta oprF$ conduit également à une augmentation de l'expression de *cmpX*, probablement via l'activité de SigX (**Bouffartigues et al., 2015**).

Un résumé des données présentées, permet de s'apercevoir qu'il existe une interconnexion fine entre les membres de cet environnement génomique, notamment entre SigX, CfrX, CmpX et OprF, mais pas forcément de CmaX.

iv. OprF

Il a été démontré qu'il existait trois promoteurs en amont de son gène (**Figure 20**) : un promoteur σ^{70} -dépendant (**Duchêne et al., 1988**), un promoteur SigX-dépendant (**Bouffartigues et al., 2012; Brinkman et al., 1999**) et un promoteur AlgU-dépendant, situé au milieu du gène *sigX* (**Firoved et al., 2002**), preuve de l'importance de cette protéine dans la réponse au stress d'enveloppe.

Il a été également montré qu'AmpR, un régulateur transcriptionnel global notamment impliqué dans la réponse au stress, pouvait réguler *oprF* (**Balasubramanian et al., 2014**).

Objectifs de thèse

Dans un contexte mondial d'accroissement de l'antibiorésistance, de nouvelles thérapies alternatives aux antibiotiques, doivent être recherchées. De plus, l'implication majeure de *P. aeruginosa* dans l'augmentation de la morbidité dans le cadre de patients atteints de mucoviscidose nécessite de trouver des moyens d'éliminer cette bactérie des poumons de ces patients. L'enveloppe, étant au contact de l'environnement, paraît être une piste de recherche intéressante quant au développement d'antimicrobiens alternatifs. Pour cela, il est nécessaire de comprendre en détail la façon dont la bactérie répond à des agressions caractérisées contre son enveloppe.

Si AlgU est étudié depuis longtemps, de par son implication dans la conversion mucoïde des souches infectant les patients atteints de mucoviscidose, SigX apparaît ces dernières années comme étant un nouveau facteur σ ECF de réponse au stress d'enveloppe. S'il avait été montré il y a 20 ans comme étant impliqué dans l'expression d'*oprF* (Brinkman et al., 1999), ce n'est que depuis ces dernières années qu'il est réellement étudié en détail (Blanka et al., 2014; Boechat et al., 2013; Bouffartigues et al., 2015, 2014, 2012; Duchesne et al., 2013; Gicquel et al., 2013).

Si les conditions d'activation de SigX, ainsi que les grandes fonctions physiologiques régulées par ce facteur σ ECF commencent à être relativement bien connues, les régulateurs de l'expression ou de l'activité de cet ECF restent en revanche à déterminer. Il est connu que SigX puisse s'autoréguler, mais il semble que cette régulation ne soit pas directe (Chevalier et al., 2018), ce qui appuie la nécessité de trouver des régulateurs directs de cet ECF. Une étude préliminaire menée au LSM par délétions successives de la région promotrice de *sigX* couplées à des fusions transcriptionnelles, a permis de mettre en évidence l'existence de deux autres régions promotrices possédant des activités plus importantes que celle du promoteur proximal précédemment décrit (données non publiées du LSM). Ainsi, une grande région promotrice de 686 pb en amont de *sigX* a été mise en évidence.

De plus, il apparaît que les gènes localisés à proximité de *sigX*, puissent être impliqués dans la régulation de ce dernier. En effet, *cfrX* et *cmpX* sont régulés par SigX (Gicquel et al., 2013), et au vu des domaines conservés présents sur ces deux gènes (facteur anti σ putatif pour CfrX et canal mécanosensible putatif pour CmpX), il semblerait que ces trois protéines possèdent des liens fonctionnels forts et pourraient former un nouveau système, original, de transduction du

signal chez *P. aeruginosa*. Il semble alors essentiel de préciser les fonctions des membres de ce système putatif.

Cette thèse prend part à la thématique « Systèmes senseurs et transducteurs » du LMSM, laboratoire spécialisé dans l'étude des interactions entre les bactéries et leur environnement. Elle fait suite aux travaux initiés par Gwendoline Gicquel (2010-2013), qui ont portés sur l'étude du régulon de SigX et l'analyse des liens unissant OprF et SigX, et poursuivis par Rachel Duchesne (2013-2016), qui ont, eux, portés sur le rôle de SigX dans l'homéostasie de la membrane externe et le métabolisme général, ainsi que l'implication de SigX et OprF dans la formation de biofilm.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient de i) trouver de nouveaux régulateurs et de nouvelles conditions régulatrices de SigX et ii) préciser les fonctions cellulaires de CfrX et CmpX, ainsi que les interactions fonctionnelles de ces derniers avec SigX.

Résultats

I. Recherche de nouveaux régulateurs et conditions régulatrices de l'expression et/ou de l'activité de SigX

1. Caractérisation d'un mutant surproduisant le Pf4

Pour ce travail, j'ai réalisé l'ensemble des manipulations, excepté les images de microscopie électronique à balayage, réalisées en collaboration avec le Dr. Verdon (EBI, UMR7267, Université de Poitiers), le dosage des HSL réalisé en collaboration avec le Pr. Dufour (LBCM EA3884, Université de Bretagne Sud), et le séquençage du génome réalisé au LMSM par le Dr A. Boukerb.

a. Résultats

i. Constitution d'une banque de mutants par transposition

Comme mentionnée précédemment, une étude préliminaire réalisée au sein du LMSM a permis de mettre en évidence l'existence d'une grande région promotrice de 686 pb en amont de *sigX*. Afin de rechercher sans à priori des régulateurs transcriptionnels de *sigX*, une stratégie de mutagenèse aléatoire par transposition sur une souche rapportant l'activité de la région promotrice de *sigX* a été réalisée. Pour cela, une fusion transcriptionnelle a été réalisée par clonage de cette région promotrice en amont de la cassette *luxCDABE* du vecteur Mini-CTX-Lux (Hoang et al., 2000), donnant le Mini-CTX-*psigX::lux*. Ce vecteur suicide a été transféré chez *P. aeruginosa* H103 par conjugaison avec *E. coli* S17.1 (Simon et al., 1983) et le plasmide s'est intégré dans le chromosome au niveau du site *attB*, générant la souche *P. aeruginosa* dH103. Cette souche rapportant l'activité promotrice de *sigX* a ensuite été utilisée pour réaliser la banque de mutants par transposition. A cette fin, le vecteur pBT20 (Kulasekara et al., 2005), portant le transposon Mini-*HimarI* (famille des *mariner*) ainsi que la transposase hyperactive C9 (Lampe et al., 1999) a été utilisé. Ce vecteur suicide chez *P. aeruginosa* a été introduit par conjugaison avec *E. coli* S17.1, selon le protocole adapté de Kulasekara (Kulasekara, 2014). 9400 mutants ont été isolés et conservés à -80°C.

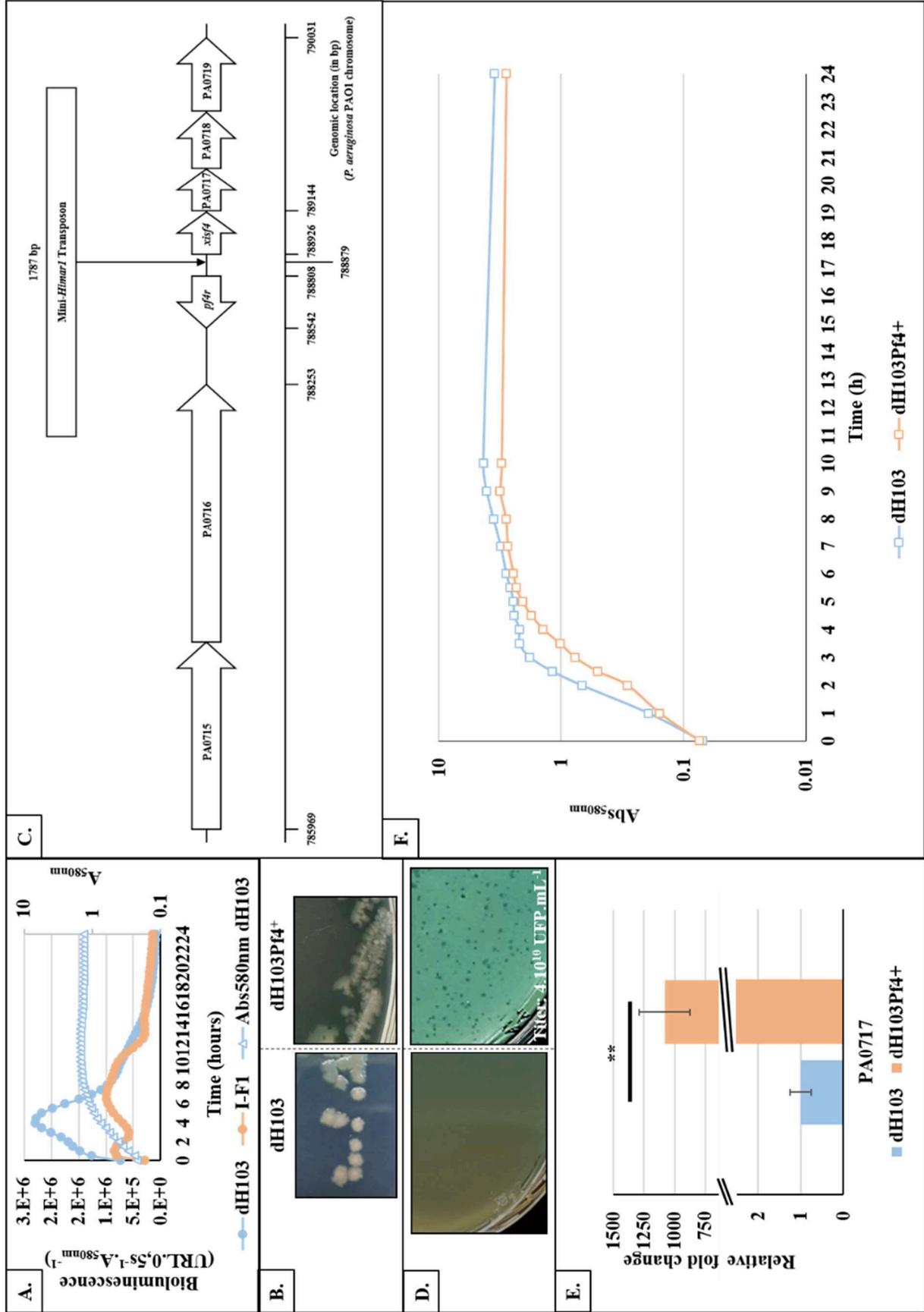


Figure 28. Isolement et caractérisation d'un mutant.

A. Croissance et bioluminescence de la souche dH103 et bioluminescence de la souche I-F1 réalisées sur un lecteur de plaque multimodal. B. Morphologie des colonies de dH103 et dH103Pf4⁺. C. Identification de la localisation du transposon par PCR semi-aléatoire. D. Plages de lyse sur *P. aeruginosa* H103 traité par les surnageants de dH103 et dH103Pf4⁺. E. Expression relative de PA0717 sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurée par RT-qPCR. F. Cinétique de croissance en erlenmeyer de dH103 et dH103Pf4⁺. Les expériences de croissance, de titration et de RT-qPCR ont été réalisées au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. ** $p < 0,01$.

La localisation de l'insertion du transposon chez les mutants d'intérêt sélectionnés pour leur profil de bioluminescence altéré en comparaison à celui de la souche dH103, a été effectuée par PCR semi-aléatoire (Chun et al., 1997), adaptée du protocole de Kulasekara (Kulasekara, 2014). Le fragment obtenu a ensuite été séquencé puis analysé par BLAST pour identifier le gène affecté par le transposon tel que décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ».

ii. Identification d'un mutant d'intérêt

Le profil de bioluminescence, témoin de l'activité normale de la région promotrice de *sigX* lors de la croissance, de dH103 est représenté sur la **Figure 28A**. Le profil est en forme de cloche, avec une forte augmentation de bioluminescence jusqu'à atteindre un pic après 5h de culture, correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance, puis une forte diminution de bioluminescence jusqu'à 8h de culture (phase stationnaire), se finissant par une diminution plus lente.

Lors du criblage par croissance sur microplaque, un des mutants nommé I-F1, montrait un profil de bioluminescence altéré par rapport au témoin dH103, ainsi qu'une diminution d'environ 50 % de la bioluminescence mesurée (**Figure 28A**). Ce phénotype s'accompagnait sur LBG, d'une morphologie altérée des colonies, laissant penser à une lyse partielle des bactéries composant la colonie (**Figure 28B**).

La localisation du transposon par PCR semi-aléatoire a permis d'identifier l'insertion du transposon au sein d'une région intergénique, entre *pf4r* et *xisF4*, deux gènes appartenant au prophage Pf4 (**Figure 28C**). Au vu de l'environnement génomique particulier dans lequel le transposon s'est inséré, nous nous sommes demandés si le phénotype particulier de lyse partielle pouvait être le résultat d'une activation du prophage Pf4.

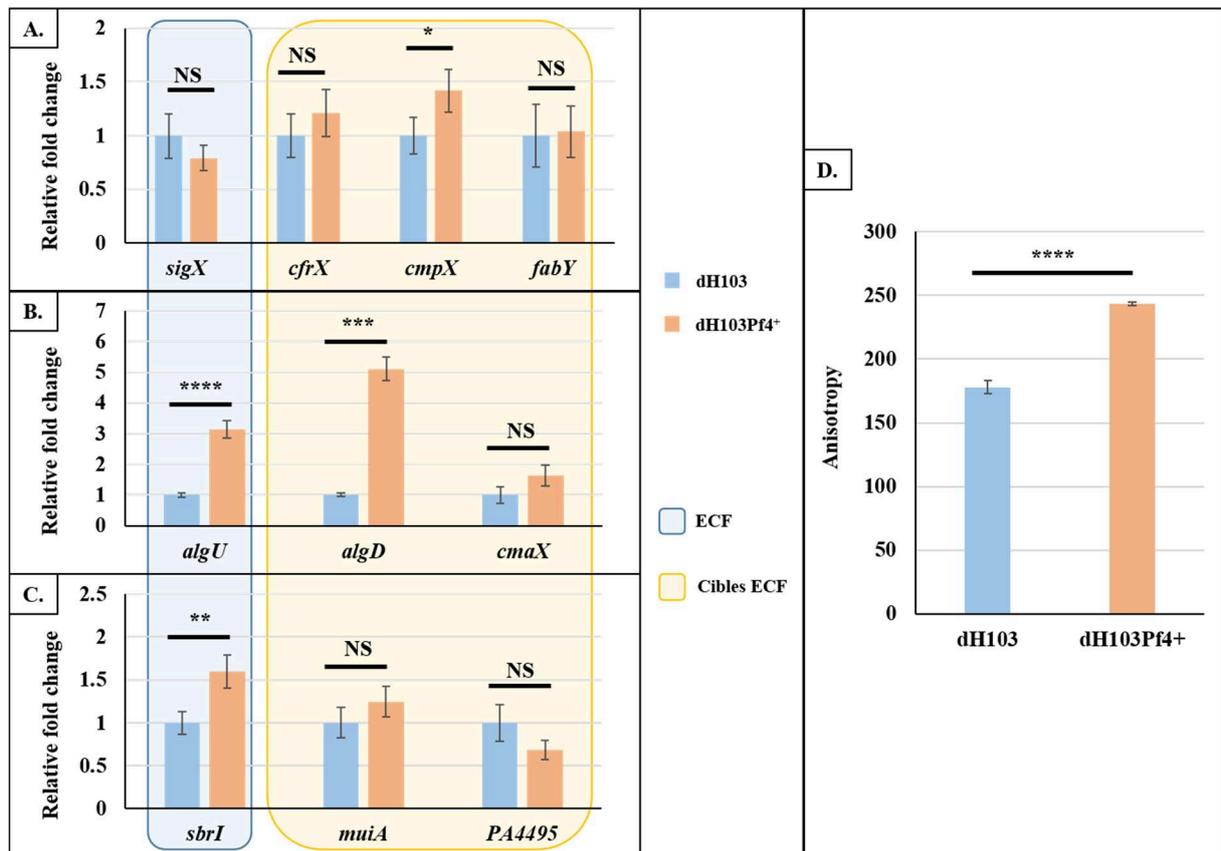


Figure 29. La souche dhH103Pf4+ subit un stress d'enveloppe médié par AlgU.

Expressions relatives de *sigX*, *cfrX*, *cmpX* et *fabY* (A.), d'*algU*, *algD* et *cmaX* (B.), et de *sbrI*, *muiA* et PA4495 (C.), sur les souches dhH103 et dhH103Pf4+ mesurées par RT-qPCR. D. Mesure de la fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence (sonde DPH) sur les souches dhH103 et dhH103Pf4+. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. ^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Dans un premier temps, le surnageant de ce mutant a été récupéré afin d'y déterminer la présence ou non de phages par la méthode des plages de lyse en double couche. Comme montré en **Figure 28D**, le surnageant de dH103 ne provoquait pas de plages de lyse sur la souche cible *P. aeruginosa* H103. En revanche, le surnageant du mutant provoquait l'apparition de plages de lyse chez la souche cible. Une titration a permis de mettre en évidence un titre à 4.10^{10} unités formant plages (UFP) par mL.

Afin de conclure quant à l'implication de ce phage dans l'apparition des plages de lyse, une RT-qPCR a été réalisée sur le gène PA0717, appartenant au locus codant le prophage Pf4. L'expression de ce gène est plus de 1000 fois plus importante chez le mutant que chez la souche témoin dH103 (**Figure 28E**), montrant que ce mutant (renommé dH103Pf4⁺) surproduisait un phage Pf4 superinfectif, car pouvant infecter *P. aeruginosa* H103 (alors qu'elle porte ce prophage sur son génome), mais également le mutant dH103Pf4⁺ (étant donné le phénotype de lyse partielle des colonies).

Cette dernière conclusion nous a incités à vérifier l'impact que pouvait avoir cette production de phages sur la croissance de la souche dH103Pf4⁺ en culture liquide. Comme montré en **Figure 28F**, la croissance de cette souche est altérée par comparaison avec la souche dH103, avec un temps de génération de 37 mn pour dH103, et de 57 mn pour dH103Pf4⁺. Elle présente donc un léger retard de croissance.

Le pic de bioluminescence chez dH103 étant vers 5h de culture, les tests présentés ci-après seront réalisés à ce temps-là, pour cette souche. En revanche, dH103Pf4⁺ présentant un retard de croissance, nous avons fait le choix de rester dans les mêmes conditions de croissance (relatifs à l'A₅₈₀ et à la phase de croissance) que pour dH103. Ainsi, les tests ont été réalisés à 7h de culture pour cette souche.

iii. Le mutant dH103Pf4⁺ présente un stress d'enveloppe

Afin de corréler la diminution de la bioluminescence à une diminution de l'expression de *sigX*, des expériences de RT-qPCR ont été réalisées sur dH103 et dH103Pf4⁺. Comme montré en **Figure 29A**, une légère diminution de l'expression de *sigX* est notée (environ 20%) chez dH103Pf4⁺, mais non significative. Son activité ne présente pas non plus de modification notable, l'expression des gènes sous sa dépendance n'étant pas modifiée significativement, exception faite de *cmpX*. L'expression de ce dernier est légèrement augmentée (fold change = 1,42), à la limite de la non-significativité. SigX a été montré pour augmenter la fluidité membranaire (Boechat et al., 2013; Flécharde et al., 2018). La fluidité membranaire de cette

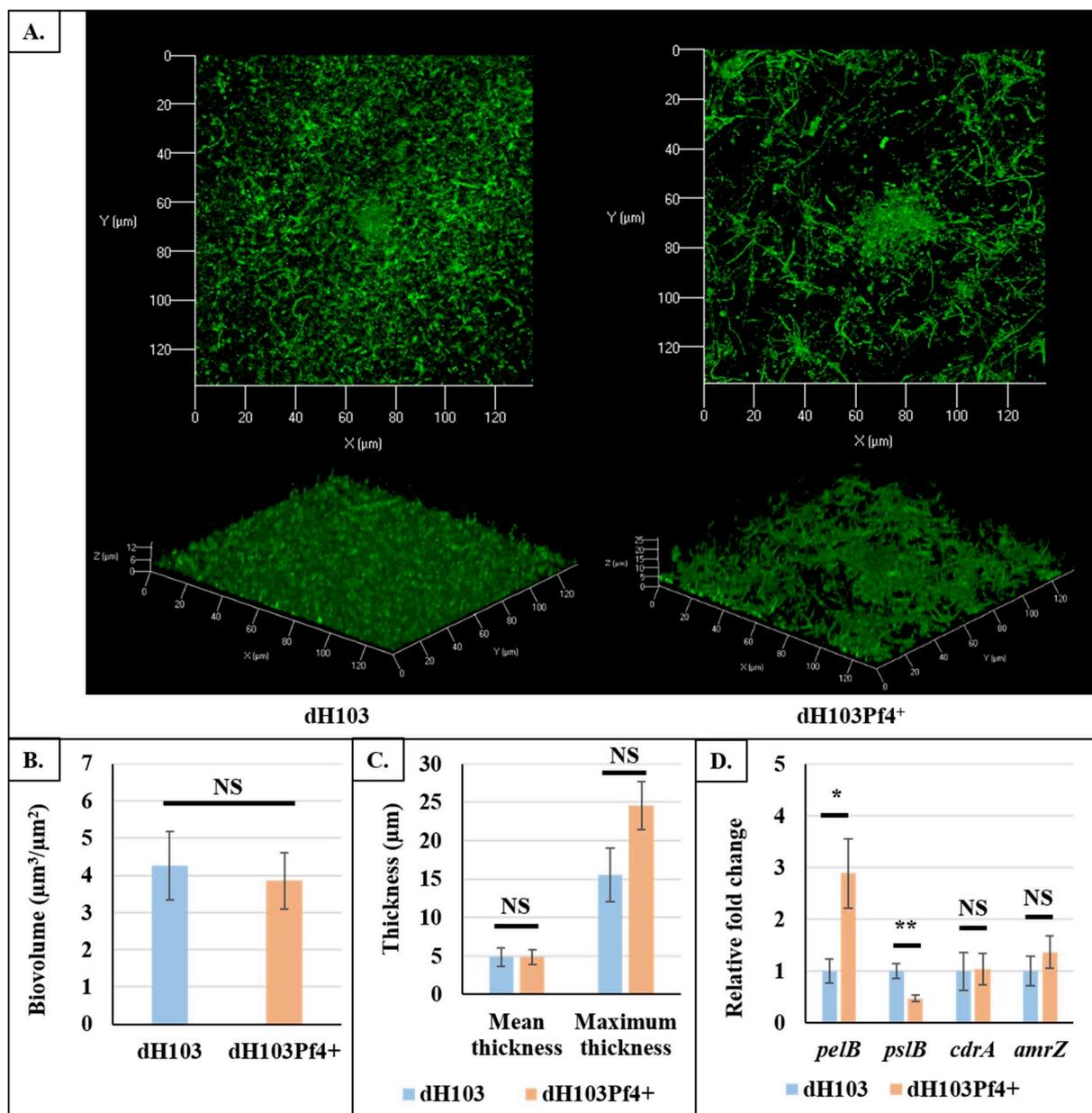


Figure 30. L'architecture et la morphologie cellulaire de la souche dH103Pf4⁺ sont altérées.

A. Images (de dessus et de profil) représentatives des biofilms formés par les souches dH103 et dH103Pf4⁺ en conditions dynamiques, marquées au SYTO9 et observées au microscope confocal à balayage laser. Les images ont été analysées par COMSTAT2, et les moyennes des biovolumes (B.) et des épaisseurs moyennes et maximales (C.) ont été calculées pour les souches dH103 et dH103Pf4⁺. D. Expressions relatives de *pelB*, *pslB*, *cdrA* et *amrZ*, sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurées par RT-qPCR. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. ^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

souche a ainsi été évaluée par anisotropie de fluorescence. Une augmentation de l'anisotropie est observée chez le mutant dH103Pf4^+ par rapport à dH103 (**Figure 29D**), signifiant une diminution de la fluidité membranaire, et donc une augmentation de la rigidité des membranes.

Les résultats obtenus par comparaison de la production de bioluminescence (**Figure 28A**) et les résultats de RT-qPCR (**Figure 29A**), ne présentent que très peu de corrélation. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce résultat. La mesure par RT-qPCR est relativement différente de celle obtenue par la production de bioluminescence. En l'occurrence, par comparaison avec la RT-qPCR, la production de bioluminescence requiert une traduction protéique ainsi que de grandes quantités d'énergie et d'oxygène pour émettre la lumière. Etant donné que le métabolisme de la souche est en partie détourné au profit de la production des phages, il est possible que ce phénotype influe sur la production de bioluminescence. Cependant, malgré l'absence de corrélation entre ces deux techniques, nous avons émis l'hypothèse que la lyse partielle observée et la production des phages filamenteux (qui traversent l'enveloppe lors de l'infection et lorsqu'ils sont excrétés) pouvaient engendrer un stress d'enveloppe.

L'expression et l'activité des 2 autres facteurs σ de réponse aux stress de l'enveloppe AlgU et SbrI ont alors été étudiées. L'expression d'AlgU, et de 2 de ses cibles *algD* et *cmxX*, est augmentée d'un facteur 3, 5 et 1,6, respectivement (**Figure 29B**), suggérant qu'AlgU est actif chez la souche dH103Pf4^+ . L'expression de *sbrI* est augmentée d'un facteur 1,6, et celle de ses cibles ne varient pas significativement (**Figure 29C**). Ce troisième système ne semble donc pas actif chez dH103Pf4^+ .

L'ensemble de ces données suggère que le mutant dH103Pf4^+ présenterait un stress d'enveloppe, dont la réponse pourrait être médiée par AlgU.

iv. L'architecture du biofilm de dH103Pf4^+ est altérée

Etant donné qu'AlgU est le régulateur principal de la production des alginate, et que l'expression du premier gène de ce cluster, *algD*, est augmentée chez dH103Pf4^+ , nous avons émis l'hypothèse que la formation de biofilm pouvait être altérée chez ce mutant. Pour cela, nous avons étudié la formation de biofilm soumis à un flux par microscopie confocale à balayage laser.

Le biofilm de la souche dH103 présente une structure relativement plate et homogène dans nos conditions. Peu de structures de type microcolonies sont visibles, et les cellules forment de petites chaînettes (**Figure 30A**). Le biofilm de la souche dH103Pf4^+ est altéré, possédant une structure plus hétérogène que celui de dH103 , ainsi que de petites microcolonies. De plus, la

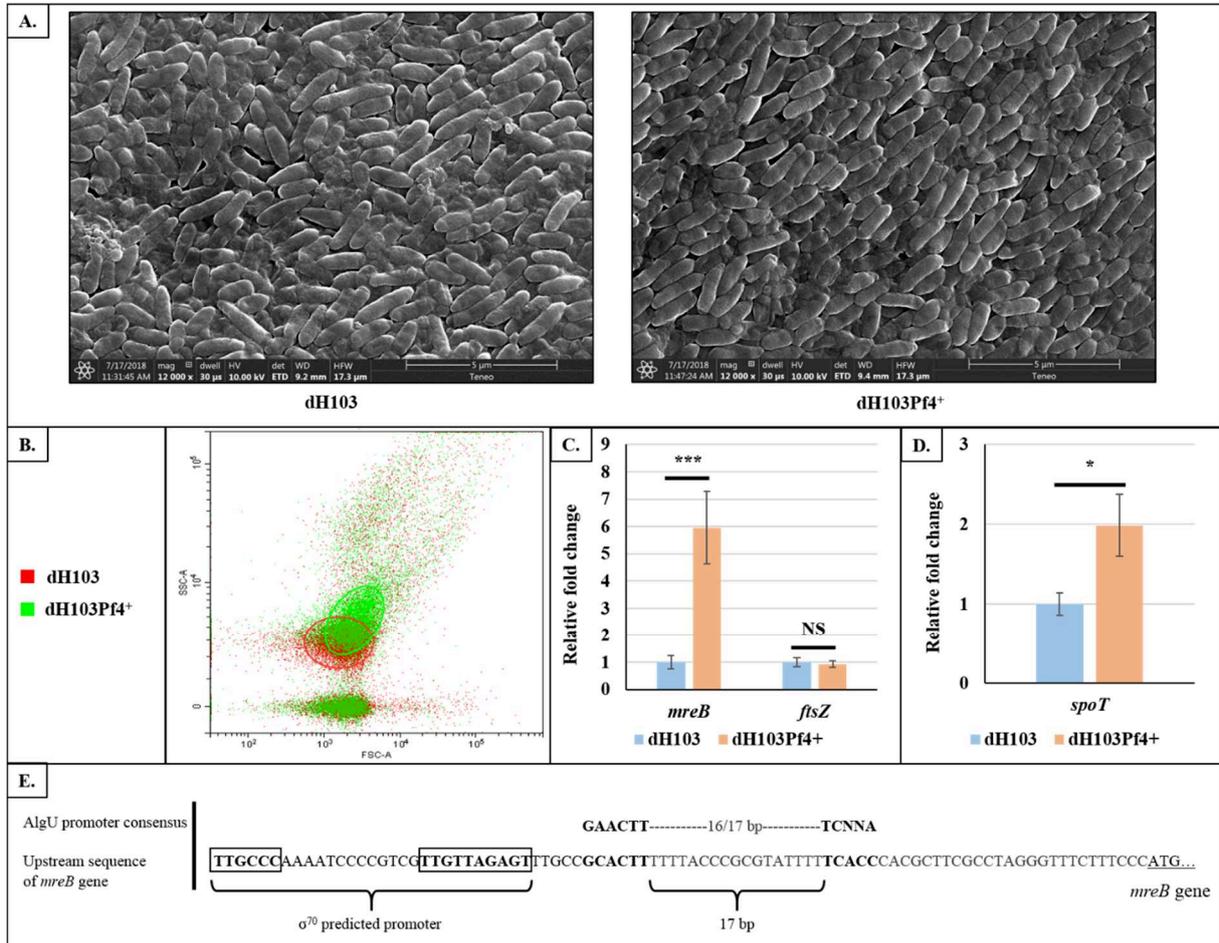


Figure 31. L'altération de la morphologie cellulaire s'accompagne de la surexpression de *mreB* et de *spoT*.

A. Images de microscopie électronique à balayage réalisées à partir de cellules planctoniques sur dH103 et dH103Pf4⁺. B. Cytogramme de cellules planctoniques dH103 et dH103Pf4⁺. Expressions relatives de *mreB* et *ftsZ* (C.), et *spoT* (D.) sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurées par RT-qPCR. E. Prédiction de promoteurs en amont du gène *mreB* par inspection visuelle et par BPROM. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. ^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

morphologie cellulaire semble impactée, avec une augmentation de la longueur des cellules de dH103Pf4⁺ (>20 µm), comparé à dH103 (**Figure 30A**).

Les analyses COMSTAT2 réalisées sur ces biofilms indiquent qu'il n'y a pas de changement significatif entre ces biofilms, que ce soit au niveau du biovolume (**Figure 30B**), ou des épaisseurs moyenne et maximale (**Figure 30C**). Ce dernier paramètre semble être tout de même légèrement augmenté dans le biofilm de la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 30C**).

Les variations en termes d'architecture du biofilm peuvent être liées à des altérations de la matrice. L'expression des gènes *pelB* et *pslB* a donc été étudiée. Alors que l'expression de *pelB* est augmentée d'un facteur 3, celle de *pslB* est diminuée de moitié environ chez la souche dH103Pf4⁺ par rapport à dH103 (**Figure 30D**). La différence d'expression de *pelB* et *pslB* pourrait donc être impliquée dans le changement d'architecture du biofilm chez la souche dH103Pf4⁺. CdrA est une protéine matricielle donc l'expression est sous le contrôle du c-di-GMP, un messenger secondaire important dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile de la bactérie. L'expression de *cdrA* n'est pas modifiée dans le mutant, suggérant que le taux de c-di-GMP est similaire dans les deux souches (**Figure 30D**). AmrZ est un régulateur majeur de la production des exopolysaccharides chez *P. aeruginosa*. AmrZ est un activateur de *pelB* et un répresseur de l'opéron *psl*. L'expression de ce gène a donc été étudiée, mais n'est pas altérée dans le mutant dH103Pf4⁺ comparativement à la souche sauvage (**Figure 30D**).

Le biofilm de la souche dH103Pf4⁺ est donc altéré au niveau de sa structure, bien qu'une analyse par le logiciel COMSTAT2 ne permette pas d'identifier de différence significative en termes de biovolume ou d'épaisseur. Cette différence pourrait être liée à une altération de la production des EPS Pel et Psl provenant de la différence d'expression de leurs gènes de biosynthèse, plutôt qu'à une différence du taux de c-di-GMP entre les deux souches.

v. La morphologie des cellules de dH103Pf4⁺ est altérée principalement en biofilm

La morphologie cellulaire a été observée par microscopie électronique à transmission à partir de cellules planctoniques. Les cellules dH103Pf4⁺ et dH103 ne présentent pas de différences majeures (**Figure 31A**). Par cytométrie en flux, les cellules dH103Pf4⁺ apparaissent légèrement plus grandes (paramètre FSC-A, **Figure 31B**), et présentent une plus grande complexité interne (paramètre SSC-A **Figure 31B**) que dH103.

Comme indiqué précédemment, en biofilm, les cellules dH103Pf4⁺ apparaissent comme filamenteuses (**Figure 30A**). La forme bacillaire est principalement liée à la protéine MreB. Une surexpression de cette dernière peut engendrer une filamentation cellulaire par inhibition

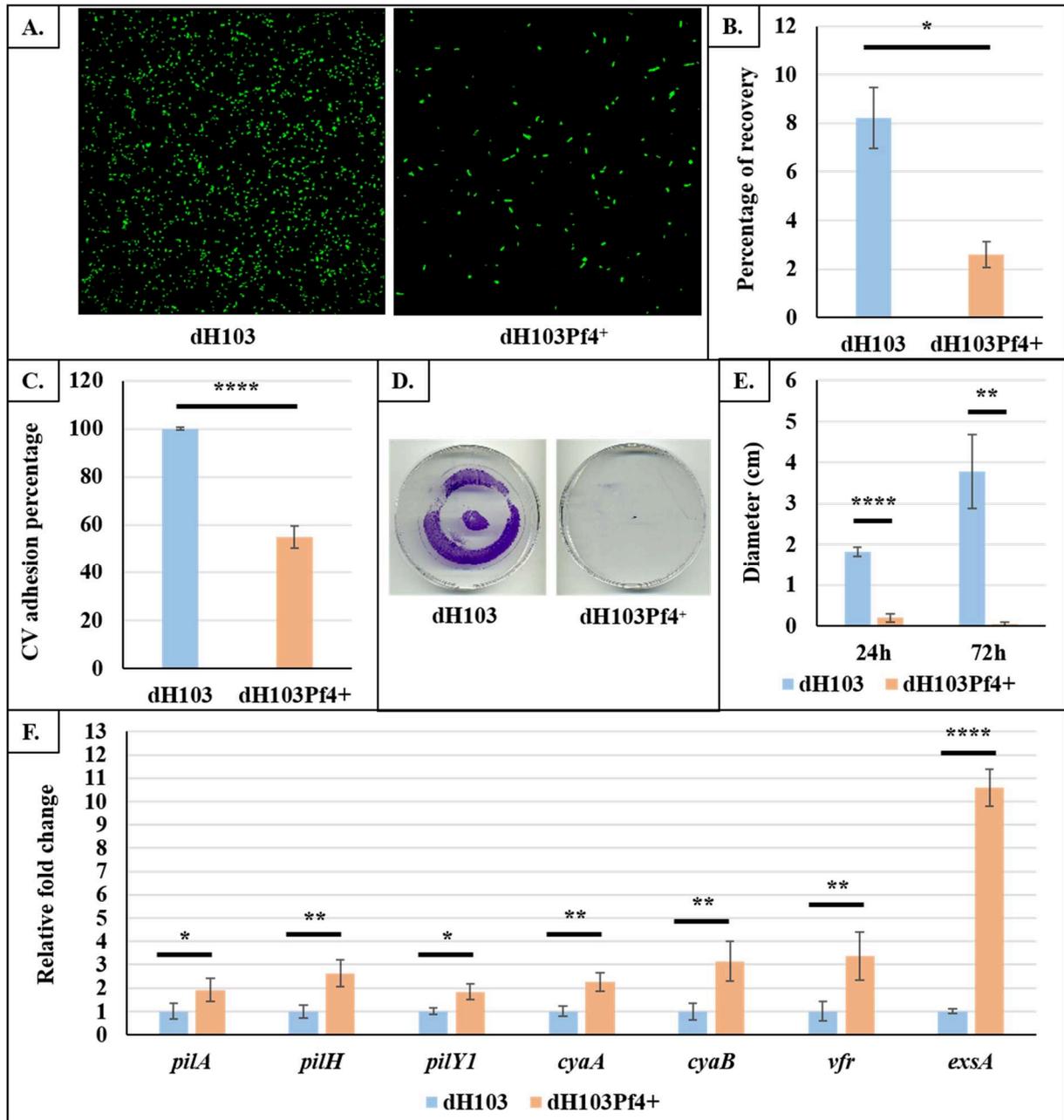


Figure 32. L'activité des pili de type IV est fortement diminuée chez la souche dH103Pf4+, et la voie Vfr/Chp semble activée.

A. Adhésion sur verre des souches dH103 et dH103Pf4+, marquées au SYTO9 et observées au microscope confocal à balayage laser. B. Taux de recouvrement obtenu à partir des images d'adhésion pour dH103 et dH103Pf4+. C. Pourcentage d'adhésion de dH103 et dH103Pf4+ sur support en plastique, coloré au cristal violet. Les données ont été normalisées selon les résultats de la souche dH103 et transformées en pourcentage. D. Mobilité de type « twitching » après 72h pour les souches dH103 et dH103Pf4+. E. Diamètres des mobilités de type « twitching », à 24h et à 72h pour les souches dH103 et dH103Pf4+. F. Expressions relatives de *pilA*, *pilH*, *pilY1*, *cyaA*, *cyaB*, *vfr* et *exsA*, sur les souches dH103 et dH103Pf4+ mesurées par RT-qPCR. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

de la division cellulaire. L'expression de *mreB* est augmentée d'un facteur 6 chez dH103Pf4⁺ comparé à dH103, tandis que celle de *ftsZ*, codant la protéine principale de la division cellulaire, n'est pas modifiée (**Figure 31C**). De façon intéressante, l'expression de *spoT* est augmentée d'un facteur 2 chez dH103Pf4⁺ (**Figure 31D**). SpoT est une enzyme permettant la synthèse et la dégradation du guanosine 5'-triphosphate-3'-diphosphate ((p)ppGpp), une alarmone, impliquée dans la réponse stringente. Cette dernière est activée dans certaines conditions de stress, comme un défaut de biogénèse de la membrane externe (**Roghanian et al., 2019**). Il a également été montré un lien entre cette alarmone et la morphologie cellulaire (**Traxler et al., 2008**). S'il semble que la filamentation cellulaire soit liée à une surexpression de *mreB* dans nos conditions, nous ne pouvons pas exclure que d'autres systèmes interviennent dans ce phénotype.

Enfin, par « inspection visuelle » de la région en amont du gène *mreB*, un promoteur possédant une séquence proche de la séquence consensus de liaison du facteur σ ECF AlgU a été identifié (**Figure 31E**). Il est donc possible qu'AlgU puisse réguler MreB dans certaines conditions. Cependant, aucune preuve expérimentale de liaison d'AlgU sur le promoteur de *mreB* n'a été réalisée, et il n'y a pas de lien direct entre ces acteurs dans la littérature. Cette observation reste donc à préciser. Enfin, un deuxième promoteur a été identifié *in silico* par BPRM, appartenant à la famille des facteurs σ^{70} (**Figure 31E**).

Il semble donc que la filamentation cellulaire ne soit observée que lors de la formation de biofilm en conditions dynamiques. En conditions planctoniques, les résultats du cytomètre de flux semble indiquer une légère augmentation de la taille cellulaire et surtout de la complexité interne des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère un allongement des cellules en biofilm, sous l'action d'un flux. Une surexpression de *mreB* pourrait être la cause de ce changement de morphologie cellulaire.

vi. La souche dH103Pf4⁺ présente un défaut d'activité des pili de type IV

Il a été décrit que le phage Pf4 utilisait le pilus de type IV comme récepteur pour débiter son cycle d'infection. Au vu de la différence d'architecture observée en biofilm, nous avons émis l'hypothèse que l'activité de ce pilus de type IV pouvait être altérée au sein de la souche dH103Pf4⁺.

Des expériences d'adhésion ont été réalisées sur lames en verre pendant 2h, puis les cellules ont été marquées et observées au microscope confocal. Une diminution de l'adhésion est observée pour la souche dH103Pf4⁺ comparée à dH103 (**Figure 32A**). Cette observation est

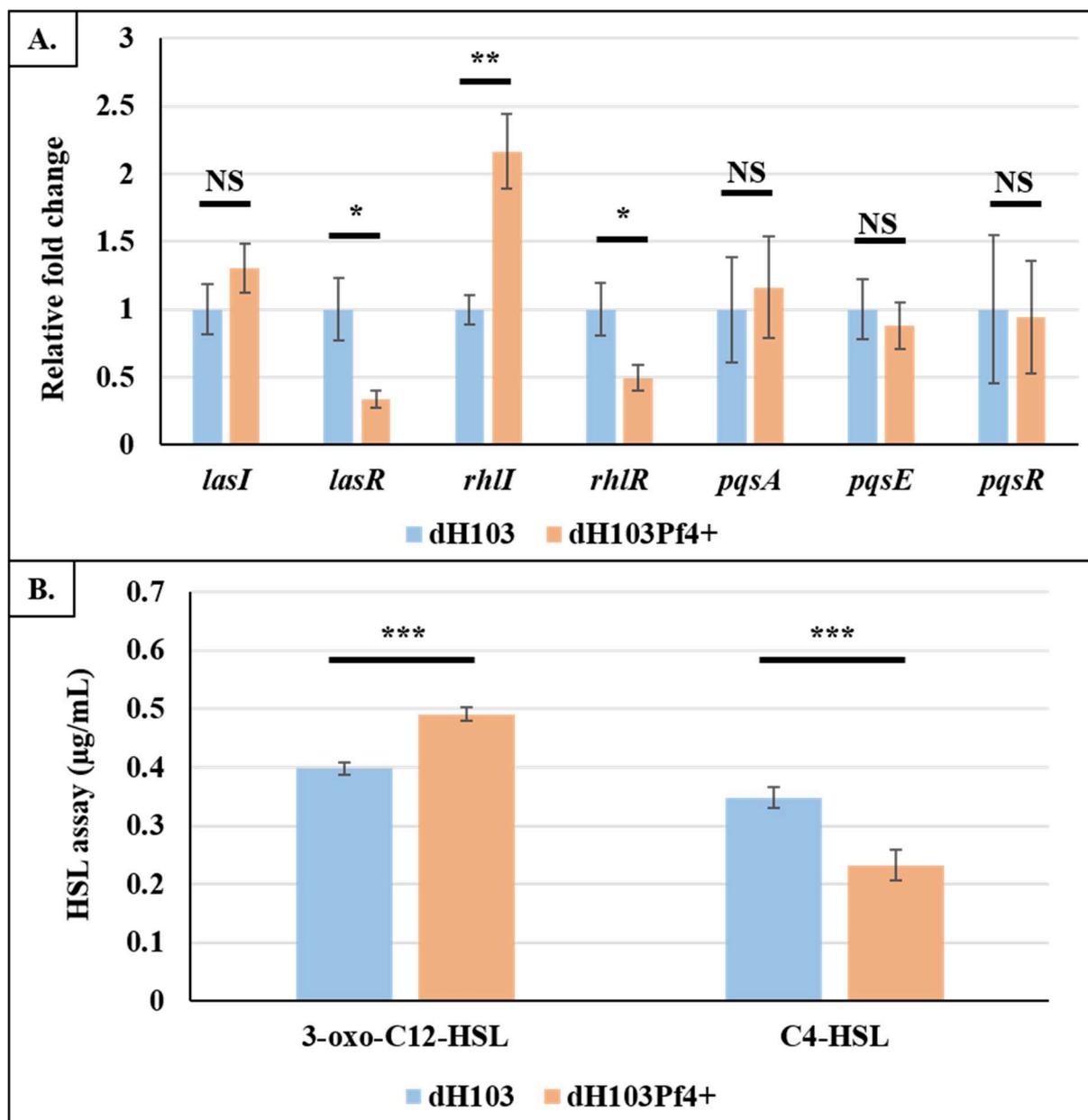


Figure 33. L'expression des gènes du QS et la production des HSL sont altérées chez la souche dH103Pf4⁺.

A. Expressions relatives de *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA*, *pqsE* et *pqsR* sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurées par RT-qPCR. B. Dosage de la 3-oxo-C₁₂-HSL et de la C₄-HSL dans les surnageants de dH103 et dH103Pf4⁺. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. ^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

correlée par l'analyse réalisée sur ImageJ des images obtenues en microscopie, avec un recouvrement cellulaire d'environ 2,6 % pour la souche dH103Pf4⁺, et de 8,2 % pour la souche dH103 (**Figure 32B**). Cette expérience d'adhésion a également été évaluée par la technique du cristal violet, sur support plastique, et les résultats montrent également une altération de l'adhésion pour la souche dH103Pf4⁺, avec une diminution d'environ 50 % par rapport à la souche dH103 (**Figure 32C**). Ces résultats indiquent un défaut d'adhésion de la souche dH103Pf4⁺.

Le pilus de type IV est un déterminant très important pour l'adhésion irréversible des cellules sur une surface, ainsi que pour la mobilité de type « twitching ». Afin de vérifier si le défaut d'adhésion était lié à une activité diminuée des pili de type IV, la mobilité de type « twitching » a été évaluée par coloration au cristal violet pour les deux souches, à 24h et à 72h, sur support en plastique. Cette mobilité est totalement abolie chez la souche dH103Pf4⁺, comparée à dH103 (**Figure 32D**). Le diamètre des mobilités de type « twitching » a été mesuré à 24h et à 72h, et confirme l'absence de mobilité de la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 32E**).

Afin d'investiguer les causes de cette absence de mobilité de type twitching, l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du pilus de type IV et dans la voie Chp/Vfr a été étudiée par RT-qPCR. L'expression des gènes *pilA*, *pilH* et *pilY1* est augmentée chez la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 32F**), suggérant que l'absence de mobilité n'est pas liée à un défaut de production. L'expression de *cyaA*, *cyaB*, *vfr* et *exsA* est augmentée chez dH103Pf4⁺ (**Figure 32F**), suggérant que la voie Chp/Vfr est activée.

L'ensemble de ces résultats suggère une absence d'activité mais pas de production des pili de type IV, empêchant la mobilité de type twitching et impactant l'adhésion des bactéries sur les surfaces.

vii. La souche dH103Pf4⁺ présente une dérégulation du QS

Vfr étant, entre autres, un régulateur du QS via l'activation de l'expression de *rhlR* et *lasR*, nous avons émis l'hypothèse que les gènes des trois systèmes du QS pouvaient être activés au niveau transcriptionnel. Alors que l'expression de *lasI* est similaire entre les deux souches, celle de *lasR* est réduite d'environ trois fois chez la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 33A**). Concernant le système Rhl, l'expression de gène *rhlI* est augmentée d'environ deux fois, et celle de *rhlR* diminuée d'un facteur 2 chez la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 33A**). Enfin les gènes *pqsA*, *pqsE* et *pqsR* appartenant au système PQS ne semblent pas présenter de différences d'expression entre les deux souches (**Figure 33A**).

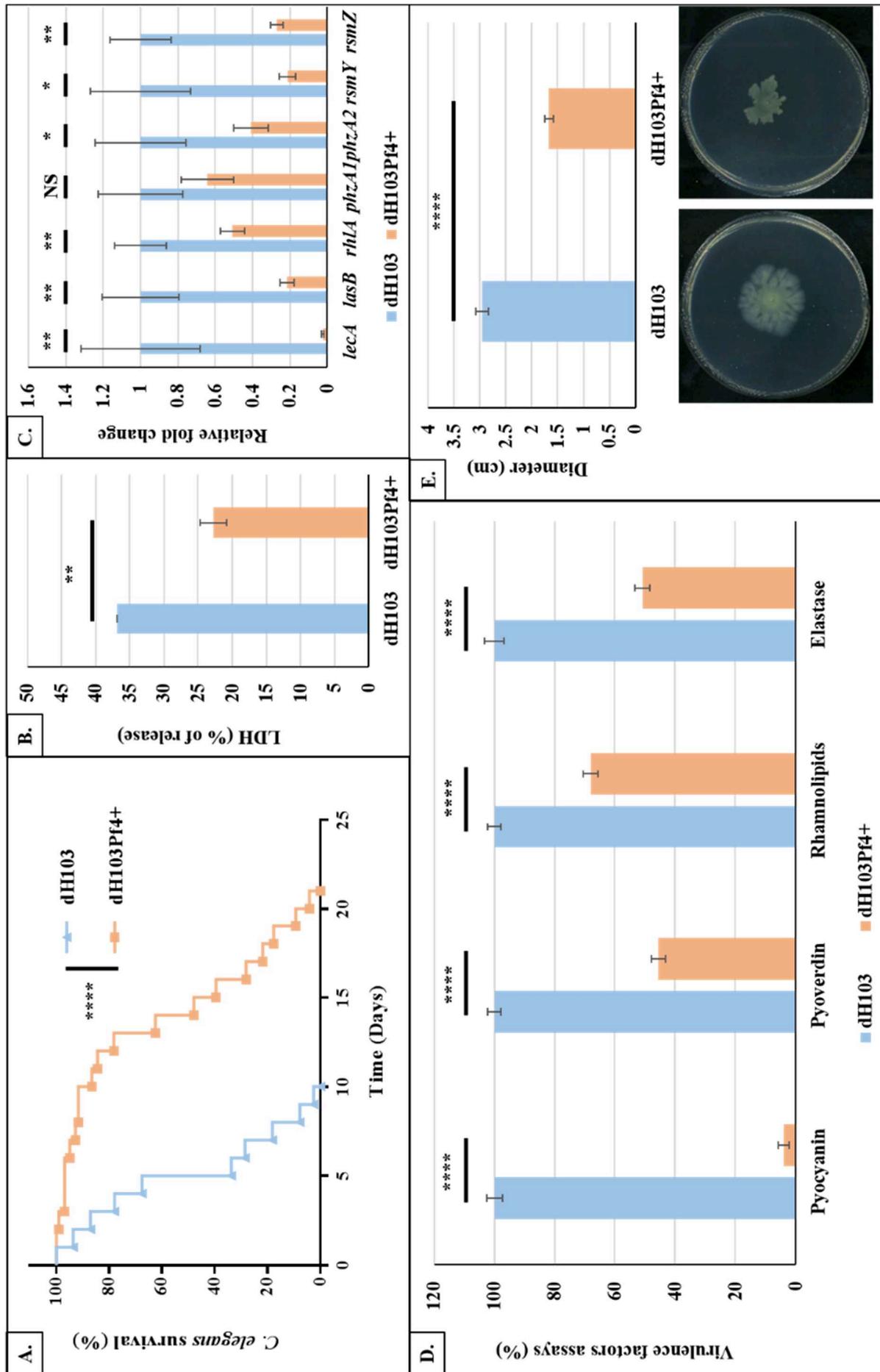


Figure 34. La souche dH103Pf4⁺ est moins virulente.

A. Courbe de survie Kaplan-Meier de *C. elegans* infecté par les souches dH103 ou dH103Pf4⁺. B. Test de cytotoxicité par mesure de la LDH sur une lignée cellulaires immortalisée A549 infectée par dH103 et dH103Pf4⁺. C. Expression relative de *lecA*, *lasB*, *rhlA*, *phzA1*, *phzA2*, *rsmY* et *rsmZ* sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurées par RT-qPCR. D. Dosage des facteurs de virulence de la pyocyanine, de la pyoverdine, des rhamnolipides et de l'activité élastase, chez dH103 et dH103Pf4⁺, exprimé en pourcentage. E. Mobilité de type « swarming » après 24h pour les souches dH103 et dH103Pf4⁺. Chaque expérience a été réalisée au moins quatre fois indépendamment. Un log rank-test a été utilisé comme test statistique pour l'expérience de virulence de *C. elegans*. Pour le reste, un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Ces résultats nous ont poussés à étudier les causes et conséquences de ces résultats. L'expression des gènes codant les facteurs de virulence sous la dépendance directe du QS a été étudiée. Ainsi, l'expression de *lasB* (codant l'élastase B) et *rhlA* (codant l'enzyme impliquée dans la première étape de biosynthèse des rhamnolipides) est diminuée chez la souche dH103Pf4⁺, d'un facteur 5 et 2, respectivement (**Figure 33B**), comme attendu au vu de la diminution de l'expression des régulateurs *lasR* et *rhlR* (**Figure 33A**). De façon surprenante, l'expression des gènes *phzA1* et *phzA2*, codant les premiers gènes des deux opérons de biosynthèse des phénazines, précurseurs de la pyocyanine, diminue également d'un facteur 1,5 et 2,5, respectivement (**Figure 33B**). En effet, il est connu que PQS régule directement l'expression de ces deux opérons, et l'expression des gènes de biosynthèse de PQS ne varie pas entre nos deux souches. Cela suggère une régulation des opérons *phzA1* et *phzA2* par un régulateur tiers, indépendant ou non du QS.

Un dosage des HSL dans les surnageants des deux souches a été réalisé par HPLC couplée à un spectromètre de masse. Alors que la concentration en 3-oxo-C₁₂-HSL semble être augmentée d'un facteur 1,2 chez dH103Pf4⁺, la concentration en C₄-HSL est réduite d'un facteur 1,5 chez dH103Pf4⁺ comparativement à dH103 (**Figure 33C**). Ces résultats suggèrent une altération des trois systèmes du QS au niveau de l'expression, de la production, voire de l'export des molécules de communication.

viii. La souche dH103Pf4⁺ présente une forte diminution de la virulence

Etant donné la diminution de l'expression de gènes codant des facteurs de virulence, un test de virulence *in vivo* chez le nématode *C. elegans* a été réalisé. Une très forte diminution de la virulence de la souche dH103Pf4⁺ a été observée par rapport à dH103 par test de slow-killing (**Figure 34A**). De plus, la mesure de la lactate déshydrogénase dans le surnageant de cellules épithéliales alvéolaires immortalisées A549 infectées par dH103 ou dH103Pf4⁺, a montré une

réduction de la cytotoxicité d'environ 40% de la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 34B**). En lien avec cette réduction de la virulence, nous avons ainsi montré une forte diminution de l'expression de *lecA* codant la lectine PA-IL (**Figure 34C**), de la production de pyocyanine (**Figure 34D**), de pyoverdine (**Figure 34E**), des rhamnolipides (**Figure 34F**), et de l'activité des élastases (**Figure 34G**). L'activité des pili de type IV et la production des rhamnolipides sont des déterminants importants pour la mobilité de type « swarming ». La **Figure 34H** montre une diminution de la mobilité de type swarming d'environ 50%, ainsi qu'une altération de la forme habituelle des halos formés sur gélose par cette mobilité chez *P. aeruginosa*. L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la diminution de la virulence observée chez la souche dH103Pf4⁺ est liée à une diminution de la production de facteurs de virulence telle que la pyocyanine, les élastases ou encore les rhamnolipides, l'abolition de la mobilité de type « twitching » et la diminution de la mobilité de type « swarming ». Il est intéressant de noter que l'expression des gènes *rsmY* et *rsmZ*, codant les deux petits ARNs séquestrant le régulateur post-transcriptionnel RsmA, est diminuée chez la souche dH103Pf4⁺ comparée à celle de dH103 (**Figure 34I**).

ix. Séquencage de la souche

Afin de s'assurer de l'absence d'un deuxième transposon sur le génome de dH103Pf4⁺, le génome de cette souche a été séquencé par Illumina Mi-Seq. L'étude de la séquence a révélé que le transposon, initialement identifié dans la région intergénique entre *pf4r* et *xisF4* par la technique de la PCR semi-aléatoire, était absent de cette région, et était retrouvé au tout début du gène PA4722 (**Figure 35A**). Ce gène, codant une probable aminotransférase, serait le premier gène d'un opéron formé avec le gène PA4721 (homologue potentiel du gène *sfsA*, codant un facteur de transcription impliqué dans la régulation du métabolisme du maltose chez *E. coli*). Ces gènes, situés en antisens, sont en amont de *dfsA*, codant un régulateur du QS (**Tableau 1**).

De façon intéressante, la région séquencée du prophage Pf4 montre 26 mutations ponctuelles, ainsi qu'une délétion de trois paires de bases, dans la région située entre *coaB* (PA0723) et PA0725 (**Figure 35B**). La majorité sont des mutations silencieuses (en bleu). Seulement quelques substitutions dans le gène PA0724 amènent à un changement d'acide aminé (en rouge), et la délétion provoque une délétion d'un acide aminé (en rouge). La caractéristique du phage Pf4 devenu superinfectif est justement une ou plusieurs mutations accumulées sur la région du prophage Pf4. Il se peut donc que la surproduction des phages Pf4 superinfectifs proviennent des mutations ponctuelles présentes sur son génome, outrepassant l'immunité

conférée par la présence du prophage sur le génome de *P. aeruginosa* H103.

b. Discussion

Nous avons isolé un mutant producteur de phages Pf4 (dH103Pf4⁺) à partir d'une banque de mutants aléatoires par transposition réalisée dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs transcriptionnels ou de nouvelles conditions régulatrices de *sigX*. Le surnageant d'une culture de ce mutant entraîne la formation de plages de lyse sur *P. aeruginosa* H103, laissant supposer la production de phages Pf4 superinfectifs. Habituellement, une bactérie portant un prophage sur son génome est immunisée contre une ré-infection de ce phage. Néanmoins, il arrive que ce mécanisme soit contourné (superinfection) et que le phage puisse infecter la bactérie hôte et s'y répliquer (Mai-Prochnow et al., 2015). Pour le Pf4, ce mécanisme est généralement lié à une ou plusieurs mutations au sein du gène *pf4r* ou de sa région promotrice (McElroy et al., 2014). De façon surprenante ici, ce sont des mutations dans des gènes codant des protéines de structure du phage qui sont retrouvées (Figure 35B). Le mécanisme sous-jacent de ce phénomène de superinfection dans nos conditions reste à élucider.

Ce mutant présente également un stress d'enveloppe, médié par AlgU (Figure 29B). Ce facteur σ est l'homologue de RpoE chez *E. coli* (Chevalier et al., 2018). Chez cette dernière, la réponse au stress d'enveloppe implique plusieurs systèmes, dont le système Psp. Il est activé en réponse à une dissipation de la force proton-motrice chez cette bactérie, pouvant être provoqué par des températures extrêmes, des fortes concentrations en éthanol ou de fortes osmolarités, la présence de protonophores ou encore une infection par des phages filamenteux (Darwin, 2005). Néanmoins, il n'existe pas de voie homologue chez *P. aeruginosa*, laissant supposer l'implication d'autres mécanismes chez cette bactérie dans le cas d'infection par ces phages filamenteux. Il a été montré chez *E. coli* des liens régulationnels entre RpoE et des gènes appartenant à un prophage cryptique (Rueggeberg et al., 2015). Chez *Salmonella enterica* Typhimurium, RpoE est impliqué dans la réponse à une infection au phage P22. Il a été montré que le phage P22 inhibe la croissance d'un mutant $\Delta rpoE$ de cette souche, et qu'un mutant $\Delta rseA$ (codant pour le facteur anti- σ de RpoE) confère une protection contre ce phage (Amar et al., 2018). Il est donc possible que l'augmentation de l'expression et de l'activité d'AlgU puisse être une réponse induite par un stress d'enveloppe provoqué par le phage filamenteux Pf4. Le mutant dH103Pf4⁺ possède des membranes plus rigides que dH103 (Figure 29D). SigX a récemment été décrit pour moduler la fluidité membranaire chez *P. aeruginosa* (Flécharde et al., 2018), par régulation de l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la

biosynthèse des acides gras (Boechat et al., 2013; Flécharde et al., 2018). Dans nos conditions, SigX présente une légère diminution de son expression, pouvant être associée à la rigidification des membranes (Figure 29A). Cependant, au regard de l'expression de *cmpX*, les résultats indiquent une tendance à l'augmentation de l'activité de SigX. Comme l'expression des autres cibles de SigX n'est pas modifiée, il est possible que CmpX puisse être sous le contrôle d'un autre régulateur. L'autre possibilité est l'existence d'un autre mécanisme. Les phages filamenteux sont décrits comme adressant leurs protéines en grande quantité dans la membrane interne, leur servant par la suite à leur excrétion à travers l'enveloppe (Hay et Lithgow, 2019). Il a été démontré *in vitro* que l'insertion de protéines membranaires intégrales pouvait moduler la rigidité membranaire (Fowler et al., 2016). Il est donc possible que l'insertion massive des protéines phagiques dans l'enveloppe puisse engendrer une rigidification des membranes, en plus de la diminution de l'expression de *sigX*. Des zones d'ombre subsistent concernant ce résultat, qui restera à préciser.

Le phage filamenteux Pf4 est maintenant bien décrit pour son rôle dans la physiologie de *P. aeruginosa* PAO1, notamment son implication dans la formation et la dispersion du biofilm. Il a été montré que l'émergence des phages superinfectifs coïncide avec l'émergence de SCV (Webb et al., 2004). Elles sont issues de bactéries dispersées et récupérées dans l'effluent d'un biofilm âgé (11 jours). Ces SCV sont composées de bactéries produisant des phages Pf4 (Webb et al., 2004), qui présentent un phénotype adhésif sur des surfaces inertes, à la différence du mutant dH103Pf4⁺ (Figure 32ABC). Le biofilm de ces souches montre une augmentation du nombre et de la taille des microcolonies au bout de 5 jours de formation de biofilm (Webb et al., 2004), qui n'est pas noté dans nos conditions (Figure 30A). Cependant, nos conditions de formation de biofilm diffèrent de cette étude, puisqu'ici, le biofilm est étudié après 24h de formation. Les conditions d'isolement des souches (SCV et dH103Pf4⁺) sont également différentes, et peuvent potentiellement expliquer les différences d'adhésion et de formation de biofilm. De plus, le génotype des phages Pf4 est connu dans nos conditions, contrairement à l'étude de 2004. Il est donc difficile d'établir d'autres comparaisons entre ces deux conditions.

Dans nos conditions, les différences observées dans la structure du biofilm peuvent être expliquées par des différences d'expression des gènes impliqués dans la production de la matrice du biofilm (Figure 30D ; Chew et al., 2014). Il a été montré qu'AmrZ était impliqué dans la régulation de l'expression des exopolysaccharides. Cependant, aucune différence d'expression n'est observée dans nos conditions, suggérant soit une modulation de son activité, soit l'implication d'autres régulateurs (Figure 30D). L'expression de *cdrA*, montré comme

étant corrélé au taux de c-di-GMP (**Rybtke et al., 2012**), n'est également pas modifié dans nos conditions (**Figure 30D**). L'ensemble de ces résultats suggère que la modification de l'architecture du biofilm de la souche dH103Pf4⁺ serait au moins partiellement liée à une différence d'expression des gènes impliqués dans la production des exopolysaccharides, médiée par un régulateur non identifié.

La différence de morphologie cellulaire observée en biofilm en conditions dynamiques n'est pas observée en conditions planctoniques (comparer **Figure 30A** et **Figure 31AB**), bien qu'il soit observée une légère augmentation de la taille cellulaire par cytométrie de flux (**Figure 31B**). Cependant, l'utilisation de cette dernière technique a révélé une augmentation de la « complexité intracellulaire » des cellules dH103Pf4⁺. Cette complexité, lorsqu'elle est augmentée sans différence de taille des cellules, a été corrélée à la présence de granules de polyhydroxyalkanoates ou de protéines dans les cellules (**Gasol et Del Giorgio, 2000**). La grande quantité de protéines produites en réponse à l'infection phagique pourrait expliquer en partie cette augmentation de complexité interne. La voie de biosynthèse des polyhydroxyalkanoates n'a pas été explorée dans cette étude, mais le sera peut-être dans de futurs travaux.

Une augmentation de l'expression du gène *mreB* a été notée chez la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 31C**). Cette protéine « actine-like » impliquée dans la forme bacillaire des bactéries, peut également être responsable de filamentation cellulaire si elle est surexprimée (**Wachi et Matsubishi, 1989**). Deux séquences promotrices ont été retrouvées en amont de ce gène, l'une prédite comme étant sous la dépendance d'un facteur σ^{70} , et l'autre prédite comme étant sous la dépendance d'AlgU (**Figure 31E**). Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse que ce gène pourrait être régulé de façon basale, mais également que son expression pourrait être modulée en fonction des conditions environnementales. Enfin, l'augmentation de l'expression de *spoT* (**Figure 31D**), dont le produit est impliqué dans réponse stringente via la synthèse et la dégradation de (p)ppGpp, peut également être responsable en partie de l'altération la morphologie cellulaire, comme décrit précédemment (**Traxler et al., 2008**).

La souche dH103Pf4⁺ présente également un défaut d'adhésion (**Figure 32ABC**). Les pili de type IV sont nécessaires à l'adhésion des bactéries aux surfaces, ainsi qu'à la mobilité de type « twitching » (**Klausen et al., 2003**). De fait, cette mobilité est affectée chez cette souche (**Figure 32DE**). Cette abolition de l'activité des pili peut être attribuée aux phages Pf4, qui les utilisent comme récepteurs, inhibant ainsi potentiellement leur activité (**Castang et Dove, 2012; Secor et al., 2015**). Les pili de type IV sont également des systèmes mécanotransducteurs,

permettant à la bactérie de ressentir les surfaces rencontrées et de transduire ce signal par la régulation d'un certain nombre de gènes (Persat et al., 2015). De fait, il est observé chez la souche dH103Pf4⁺ une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie Chp/Vfr (Figure 32F). Ces résultats suggèrent ainsi une activation de cette voie, probablement du fait de la liaison des phages Pf4 aux pili de type IV.

Vfr est un régulateur important de la virulence, capable d'activer la transcription de gènes codant des facteurs de virulence, ou capable d'induire le QS (Albus et al., 1997). Cependant, il est observé chez la souche dH103Pf4⁺ une diminution globale de la virulence, lié à une diminution de la production de facteurs de virulence (Figure 34 A à H), et à une dérégulation du QS (Figure 33 ABC). De façon intéressante, il a été décrit des liens entre le QS et la résistance aux infections phagiques (Rémy et al., 2018). Chez *E. coli*, il a été montré que l'ajout d'HSL synthétiques induisait une résistance au phage λ , par la diminution du taux d'absorption cellulaire provoquée par la diminution du nombre de récepteurs LamB au phage λ , à la surface de la bactérie (Høyland-Kroghsbo et al., 2013). Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que le QS pouvait intervenir dans la résistance aux phages D3112cts (Glessner et al., 1999). Enfin, une étude transcriptomique et de Chip-Seq a récemment été réalisée sur 20 régulateurs transcriptionnels chez *P. aeruginosa*. Cette étude montre que LasR pourrait réguler 8 des 13 gènes composant le prophage Pf4 (Huang et al., 2019). Ainsi, il se pourrait que la dérégulation du QS chez la souche dH103Pf4⁺ puisse être la conséquence d'une adaptation de la bactérie à sa production de phages (via un régulateur tiers, par exemple), dans le but de limiter la lyse induite par ces phages superinfectifs et outrepassant la régulation positive normalement engendrée par Vfr.

La conséquence de la dérégulation du QS est une diminution des facteurs de virulence et de la virulence globale de la souche dH103Pf4⁺ (Figure 34A à H). Un phage est un parasite détournant le métabolisme de la bactérie pour se répliquer, et ce mécanisme pourrait être la cause de la diminution de la virulence. Néanmoins, de nombreux exemples de phages amenant des gènes de virulence lors de l'infection d'une bactérie ont été décrits. Par exemple, un des exemples les plus connus concerne la pathogénicité des souches de *Vibrio cholerae* pour l'Homme, qui provient de l'infection de ces dernières par le phage filamenteux CTX ϕ . Ce phage porte en effet sur son génome les gènes codant pour la toxine cholérique (Kim et al., 2017). La diminution de la virulence chez la souche dH103Pf4⁺ pourrait donc être en partie la conséquence de la dérégulation du QS.

La voie Gac/Rsm semble affectée chez la souche dH103Pf4⁺ (**Figure 34I**). Il a été montré que RetS était activé, et inhibait la transcription de *rsmY* et *rsmZ* via l'inhibition du TCS GacS/GacA, en réponse à la présence de débris cellulaires issus de bactéries de la même espèce (**LeRoux et al., 2015**). Etant donné que chez la souche dH103Pf4⁺ présente une lyse partielle des cellules de sa population et que l'expression de *rsmY* et *rsmZ* est très diminuée, il est possible que cette voie soit activée. RsmA étant libre, cette protéine pourrait contribuer à la dérégulation du QS, de la pyocyanine ou encore des exopolysaccharides chez la souche dH103Pf4⁺.

La pyoverdine est un des sidérophores de *P. aeruginosa*. La souche dH103Pf4⁺ présente une diminution de la production de ces sidérophores par rapport à la souche dH103 (**Figure 34E**). Il a été décrit que le phage Pf4 pouvait chélater le fer, le rendant indisponible et inhibant ainsi la croissance de *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus*, conférant à *P. aeruginosa* un avantage pour la colonisation de niches écologiques (**Nazik et al., 2017; Penner et al., 2016; Secor et al., 2017**). De plus, une diminution de la pyoverdine a aussi été notée dans le cas d'une infection aigüe de *P. aeruginosa* par les phages Pf4 (**Secor et al., 2017**). Collectivement, ces données suggèrent que le phage Pf4 pourrait permettre l'incorporation du fer dans la bactérie, conduisant à une diminution de la pyoverdine produite. Cette hypothèse reste à vérifier.

Enfin, la localisation du transposon a été initialement identifiée par PCR semi-aléatoire. Cependant, un séquençage du génome entier a révélé que ce transposon se trouvait en réalité au début du gène PA4722 (**Figure 35A**), et que la région du prophage Pf4 possédait 26 substitutions et une délétion de trois nucléotides (**Figure 35B**). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence majeure dans ces résultats.

La première est que le transposon se trouvait initialement dans cette région, confirmant le résultat de la PCR semi-aléatoire, et aurait transposé dans un autre endroit du génome, au sein du gène PA4722. En effet, deux réflexions nous ont orientés sur cette hypothèse. Tout d'abord, les résultats du séquençage du génome ont révélé la présence du plasmide pBT20 portant la transposase dans la souche dH103Pf4⁺, bien que ce dernier ne soit pas répliatif chez *P. aeruginosa*. Bien que ce résultat ne soit pas encore expliqué, il peut en tout cas être à l'origine de la transposition secondaire putative. Ensuite, la PCR semi-aléatoire a été réalisée sur l'ADN génomique d'une culture du mutant, directement ensemencée à partir de la banque de transposon. Le séquençage a, lui, été réalisé sur l'ADN génomique provenant d'une culture du mutant ensemencée à partir d'un ré-isolément effectué dans le but d'éviter de possibles contaminations. Si cette hypothèse est exacte, il est possible que ce soit lors du ré-isolément

que la seconde transposition ait eu lieu. Cependant, cela impliquerait que le transposon ne soit pas stable lors des études phénotypiques. Or, d'une culture à une autre, les résultats sont reproductibles, preuve d'une certaine « stabilité » du transposon.

La seconde hypothèse pourrait être un problème lié à la PCR semi-aléatoire. L'utilisation d'amorces dégénérées peut engendrer de faux positifs et ainsi amplifier des régions du génome. L'utilisation de cette PCR pour la localisation du transposon dans trois autres mutants d'intérêt a également conduit à l'identification de cette région du prophage, semblant indiquer soit un hotspot de transposition, soit des faux positifs engendrés par les amorces utilisées dans cette PCR semi-aléatoire.

Dans les deux cas, le problème inhérent aux résultats obtenus lors de ces travaux reste le même. Les phénotypes obtenus sont-ils associés à la multitude de mutations présentes dans la région du prophage, menant à la production des phages superinfectifs, ou bien à la mutation du gène PA4722 ? De plus, ce dernier est également en opéron avec PA4721, laissant supposer un effet polaire de la mutation par le transposon sur PA4721. Ce transposon pourrait également influencer la région en amont de PA4722, et notamment le gène *dksA*, codant entre autres un régulateur du QS. Afin de répondre à la question, il est envisagé soit de déléter le transposon du gène PA4721, soit de reproduire les mutations ponctuelles dans le prophage chez *P. aeruginosa* H103, et de vérifier les phénotypes préalablement obtenus afin de corréler le génotype aux phénotypes.

2. L'infection par les phages Pf4 induit une réponse au stress d'enveloppe chez *P. aeruginosa*

A la suite des résultats obtenus avec la souche dH103Pf4⁺, nous avons émis l'hypothèse que la souche dH103Pf4⁺ était une souche qui s'était adaptée à la production de ces phages Pf4, superinfectifs et responsables d'une lyse partielle, lui permettant de croître. Nous avons ainsi voulu évaluer si un traitement de *P. aeruginosa* H103 par ces phages Pf4 pouvait induire une réponse différente de celle du mutant, notamment au niveau de la réponse au stress d'enveloppe.

De fait, nous avons montré par RT-qPCR qu'un traitement par des phages Pf4 induit une réponse au stress d'enveloppe médiée par SigX et AlgU, conduisant à une augmentation de la fluidité membranaire et, via la régulation d'AmrZ, à une modification de l'architecture du biofilm en condition dynamique liée à une dérégulation de l'expression des gènes codant pour

les exopolysaccharides potentiellement médiée par une augmentation du taux intracellulaire de c-di-GMP. De plus, il est observé une modification de la morphologie cellulaire, associée à une activation de la réponse SOS, et une surexpression de *mreB*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'infection par les phages Pf4 induit une réponse au stress d'enveloppe conduisant la bactérie à s'orienter vers un mode de vie biofilm.

Dans cette étude, j'ai effectué l'ensemble des manipulations, excepté le dosage du c-di-GMP réalisé en collaboration avec le Dr. Brenner-Weiß (KIT, Allemagne), les images de microscopie électronique réalisées par le Dr. Verdon (EBI, UMR6267, Université de Poitiers), les RT-qPCR de la réponse SOS, et le séquençage de la souche. J'ai également participé activement à l'orientation et à la rédaction de l'article.

Pf4 phage infection induces SOS and cell envelope stress responses in *Pseudomonas aeruginosa*

Damien TORTUEL¹, Ali Tahrioui¹, Sophie RODRIGUEZ¹, Mélyssa CAMBRONEL¹, Amine M. Boukerb¹, Maillot Olivier¹, Julien Verdon², Emile BERE³, Michael NUSSE⁴, Gerald Brenner-Weiss⁴, Audrey DAVID¹, Onyedikachi C. AZUAMA¹, Marc G. Feuilloley¹, Nicole ORANGE¹, Olivier Lesouhaitier¹, Pierre Cornelis¹, Sylvie Chevalier^{1*}, Emeline Bouffartigues^{1*}

¹EA4312 Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen, France,

²UMR7267 Ecologie et biologie des interactions (EBI), France, ³Image UP, Service de Microscopie électronique et Photonique, Pôle Biologie Santé, Université de Poitiers, Campus Sciences, France,

⁴Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany

Submitted to Journal:

Frontiers in Microbiology

Specialty Section:

Microbial Physiology and Metabolism

Article type:

Original Research Article

Manuscript ID:

518025

Received on:

06 Dec 2019

Frontiers website link:

www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

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

Author contribution statement

E.B., S.C., D.T. designed the experiments. D.T., M.C., A.T., E.B., S.R., J.V., E.Be., O.M., A.D., O.C.A., G.B-W., M.N., A.M.B., S.C. conducted experiments and analyzed the data. E.B., S.C., P.C., D.T., O.L., A.T., M.F. and N.O. contributed to the writing of the manuscript.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, Pf4 phage, SigX, AlgU, Cell Shape, Biofilm, c-di-GMP, Membrane Fluidity, SOS response, Cell wall stress response

Abstract

Word count: 213

Pseudomonas aeruginosa PAO1 has an integrated Pf4 prophage in its genome, encoding a relatively well-characterized filamentous phage, which contributes to the bacterial biofilm organization and maturation. Pf4 variants are considered as superinfectives when they can re-infect and kill the prophage-carrying host. Herein, the response of *P. aeruginosa* H103 to superinfective Pf4 variant infection was investigated. This phage variant caused partial lysis of the bacterial population and modulated H103 physiology. We showed by confocal laser scanning microscopy that a Pf4 variant-infection led to *P. aeruginosa* H103 biofilm architecture alteration in both static and dynamic conditions. Interestingly, in the latter condition, numerous cells displayed a filamentous morphology, suggesting a link between this phenotype and flow-related forces under Pf4 phage variant treatment. Therefore, Pf4 infection resulted in increased SOS stress response together with cell envelope stress response mediated by the two extracytoplasmic function sigma factors AlgU and SigX. Activity of AlgU and SigX may account, at least partly, for the enhanced expression level of genes involved in the biosynthesis pathways of two matrix exopolysaccharides (Pel and alginates) and c-di-GMP metabolism. In addition, the high abundance of mreB transcripts, potentially positively regulated by AlgU, suggests a link between the regulation of the cell shape and the reorganization of cytoskeletal-like structures in response to Pf4 phage variant infection.

Contribution to the field

Pseudomonas aeruginosa PAO1 has an integrated Pf4 prophage in its genome, encoding a relatively well-characterized filamentous phage, which contributes to the bacterial biofilm organization and maturation. Pf4 variants are considered as superinfectives when they can re-infect and kill the prophage-carrying host. Herein, the response of *P. aeruginosa* H103 to superinfective Pf4 variant infection was investigated. We show that Pf4 filamentous phage infection results in two major stress responses, i.e. the SOS response leading to elongated cell, and an extensive cell envelope stress response, mediated by the two major extracytoplasmic function σ factors SigX and AlgU. Drastic phenotypes were observed in response to Pf4 infection at the level of the cell, as increased membrane fluidity related to SigX hyperactivity, and altered cell morphology linked most likely to induction of the SOS response and AlgU activity.

Funding statement

The LMSM is supported by the Région Normandie (France), Evreux Portes de Normandie (France) and European FEDER funds. D.T. and A.D. are supported by doctoral fellowships from the Région Normandie (France), and M.C. from the French ministry (MENRT). A.T., A.M.B. and S.R. are supported by post-doctoral fellowships from European Union (FEDER) and Région Normandie (France). O.C.A. is a recipient of a postgraduate fellowship from Campus France and FUNAI (Nigeria). M.N. and G.B.W. acknowledge support from the Helmholtz program BioInterfaces in Technology and Medicine (BIFTM) of KIT. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit this work for publication.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

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

Studies involving human subjects

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

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

In review

Data availability statement

Generated Statement: All datasets generated for this study are included in the manuscript/ supplementary files.

In review

**Pf4 phage infection induces SOS and cell envelope stress responses in
*Pseudomonas aeruginosa***

Damien Tortuel¹, Ali Tahrioui¹, Sophie Rodrigues¹, Mélyssa Cambrone¹, Amine M Boukerb¹, Olivier Maillot¹, Julien Verdon², Emile Bere², Michael Nusser³, Gerald Brenner-Weiss³, Audrey David¹, Onyedikachi Cecil Azuama¹, Marc GJ Feuilleley¹, Nicole Orange¹, Olivier Lesouhaitier¹, Pierre Cornelis¹, Sylvie Chevalier^{1*} and Emeline Bouffartigues^{1*}

¹Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, LMSM EA4312, Évreux, France.

²Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers, France.

³Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany.

* Corresponding Authors:

Dr. Emeline Bouffartigues, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France. Tel: +33-235140000; Fax: +33-232291550; emeline.bouffartigues@univ-rouen.fr

Pr Sylvie Chevalier, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France. Tel: +33-235140000; Fax: +33-232291550; sylvie.chevalier@univ-rouen.fr

Running title: Pf4 infection induces stress responses

- 1 Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Pf4 phage, SigX, AlgU, Cell shape, biofilm, c-di-GMP,
- 2 membrane fluidity, SOS response, cell wall stress response

3 **ABSTRACT**

4 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 has an integrated Pf4 prophage in its genome, encoding a
5 relatively well-characterized filamentous phage, which contributes to the bacterial biofilm
6 organization and maturation. Pf4 variants are considered as superinfectives when they can re-
7 infect and kill the prophage-carrying host. Herein, the response of *P. aeruginosa* H103 to
8 superinfective Pf4 variant infection was investigated. This phage variant caused partial lysis of
9 the bacterial population and modulated H103 physiology. We showed by confocal laser
10 scanning microscopy that a Pf4 variant-infection led to *P. aeruginosa* H103 biofilm architecture
11 alteration in both static and dynamic conditions. Interestingly, in the latter condition, numerous
12 cells displayed a filamentous morphology, suggesting a link between this phenotype and flow-
13 related forces under Pf4 phage variant treatment. Therefore, Pf4 infection resulted in increased
14 SOS stress response together with cell envelope stress response mediated by the two
15 extracytoplasmic function sigma factors AlgU and SigX. Activity of AlgU and SigX may
16 account, at least partly, for the enhanced expression level of genes involved in the biosynthesis
17 pathways of two matrix exopolysaccharides (Pel and alginates) and c-di-GMP metabolism. In
18 addition, the high abundance of *mreB* transcripts, potentially positively regulated by AlgU,
19 suggests a link between the regulation of the cell shape and the reorganization of cytoskeletal-
20 like structures in response to Pf4 phage variant infection.

21 INTRODUCTION

22 *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative human opportunistic pathogen that can be
23 isolated from most environments, including soil, marshes, coastal marine habitats, plants,
24 nematodes and mammal tissue (Goldberg, 2000; Spiers et al., 2000). It is responsible for
25 infections of the lungs, urinary tract, and burn wounds (Lyczak et al., 2000). The ability of *P.*
26 *aeruginosa* to form biofilms, which are matrix-enclosed (Wei and Ma, 2013), surface-
27 associated, multi-cellular assemblages that protect cells in hostile environments such as
28 phagocytosis (Hoiby et al., 2010), contributes to its persistence in lung infections (Ryder et al.,
29 2007).

30 Filamentous phages (Inoviruses) are widespread in the microbial world and are characterized
31 by their long and thin filamentous shape and a circular single stranded DNA genome (Mai-
32 Prochnow et al., 2015; Roux et al., 2019). In Gram-negative bacteria, filamentous phages
33 generally become lysogens, with the phage genome either being integrated into the bacterial
34 chromosome or remaining extrachromosomal as an episome (Mai-Prochnow et al., 2015). *P.*
35 *aeruginosa* strains integrate in their genome several filamentous bacteriophages designated as
36 Pf phages (Pf1 to Pf6). *P. aeruginosa* PAO1 strain contains only Pf4, which is most closely
37 related (63% identity) to Pf5 of PA14 strain, and to a lesser extent, to Pf1 of PAK strain (Mai-
38 Prochnow et al., 2015). While Pf4 and Pf5 are maintained as prophages, Pf1 replicates
39 exclusively as an episome (Mooij et al., 2007). There is an evidence of a conserved pathway of
40 infection among different classes of filamentous bacteriophages, since they can infect different
41 bacteria through molecular recognition of a host-specific pilin (Rakonjac et al., 2011). Hence,
42 bacteriophages Pf1 and Pf4 were shown to interact with the type IV pili (TFP) from PAK
43 (Holland et al., 2006) and PAO1 (Castang and Dove, 2012; McElroy et al., 2014), respectively,
44 whereas bacteriophage Pf3 interacts with the conjugative RP4 pilus instead of the type IV PAO
45 pilus (Holland et al., 2006).

46 Clinical data show that Pf phages are produced by *P. aeruginosa* isolates from sputum of
47 cystic fibrosis (CF) individuals (Webb et al., 2004; Kirov et al., 2007; Platt et al., 2008), at a
48 concentration average 10^7 copies of Pf phage.mL⁻¹ sputum (Secor et al., 2015a; Secor et al.,
49 2015b). Moreover, the prophage is found in *P. aeruginosa* isolates collected from patients with
50 CF and in other clinical settings (Finnan et al., 2004; Mathee et al., 2008; Knezevic et al., 2015;
51 Burgener et al., 2019). Increasing evidences demonstrate that filamentous phages can strongly
52 affect biofilm maturation as well as biofilm dispersal (Webb et al., 2004; Rice et al., 2009). Pf4
53 was indeed shown to be involved in matrix structuration (Secor et al., 2015a), and to increase
54 cell lysis leading to extracellular DNA (eDNA) release into biofilm cultures (Whiteley et al.,

55 2001; Stanley et al., 2003; Webb et al., 2004; Domka et al., 2007). In addition, Pf4 infection
56 can lead to the emergence of small colony variants (Webb et al., 2003; Webb et al., 2004; Secor
57 et al., 2015b). Deletion of the whole prophage region results in less-stable biofilm when
58 challenged with the surfactant sodium dodecyl sulfate (Rice et al., 2009). The Pf4 genome was
59 shown to contain one of the most highly induced set of genes during biofilm formation
60 relatively to planktonic growth. These genes were found to be highly upregulated when *P.*
61 *aeruginosa* is grown under anaerobic conditions (Whiteley et al., 2001), in the presence of 15
62 mM nitrite (Platt et al., 2008), and the corresponding proteins were overproduced in response
63 to solid surfaces attachment (Guilbaud et al., 2017). Interestingly, these biofilm phenotypes
64 correlate with the conversion of Pf4 phage into a superinfective variant that re-infects and kills
65 the prophage-carrying host (Hui et al., 2014). It was observed that this variant is characterized
66 by several mutations, which are, for most of them, located within or upstream of *repC*, a Pf4-
67 encoded repressor involved in the lytic pathway (McElroy et al., 2014), recently renamed *pf4r*
68 (Li et al., 2019). Such mutations have been suggested to result from DNA lesions in response
69 to reactive oxygen or nitrogen species accumulation during growth in biofilm and the oxidative
70 stress response regulator OxyR has been shown to bind to a region overlapping the *pf4r* open
71 reading frame (Wei et al., 2012; Hui et al., 2014).

72 Stress conditions leading to DNA damages are known to induce the SOS response, allowing
73 repair of genetic material to enhance cell survival (Baharoglu and Mazel, 2014). The SOS
74 response involves genes that not only affect cellular processes, such as DNA recombination and
75 repair, but also affect pathogenesis, antimicrobial resistance, and biofilm production (Beaber et
76 al., 2004; Irazoki et al., 2016). The proteins that make up the SOS system include a
77 transcriptional repressor called LexA and a DNA-binding activating protein, RecA. The SOS
78 response is initiated when RecA binds to damaged single stranded DNA and induces the
79 autocatalytic cleavage of the LexA repressor (Kelley, 2006), resulting in the de-repression of
80 genes involved in the SOS response. In *P. aeruginosa*, LexA regulates the expression of 15
81 genes, most of which are involved in DNA repair, and an inhibitor of cell division, *sulA*, that
82 causes cell filamentation (Breidenstein et al., 2012). Growing evidences tend to suggest that
83 phage infection may induce the SOS response. Indeed, transcriptional response of *Salmonella*
84 *enterica* Typhimurium to phage exposure indicate activation of the SOS response (Wang et al.,
85 2019). Single stranded filamentous phage infection also leads to SOS response in *E. coli*
86 (Higashitani et al., 1992). In addition, active prophages can be excised from the host
87 chromosome (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, for example) upon SOS
88 response (Wang and Wood, 2016).

89 In *P. aeruginosa*, the cell envelope stress response (CESR) can detect cell wall integrity
90 alterations and reprogram gene expression to ensure bacterial survival. The underlying signal
91 transduction is mediated partly by extracytoplasmic function (ECF) σ factors. It has been shown
92 that *P. aeruginosa* harbors two major CESR systems based on the two ECF σ factors AlgU and
93 SigX (Chevalier et al., 2019). More precisely, AlgU is homologous to the *Escherichia coli*
94 RpoE cell wall stress response σ factor that is mainly involved in outer membrane and
95 peptidoglycan homeostasis (Wood et al., 2006; Wood and Ohman, 2009). AlgU is activated in
96 response to hyperosmolarity (Aspedon et al., 2006), peptidoglycan synthesis alterations (Wood
97 et al., 2006; Wood and Ohman, 2009) or cell wall perturbations related to absence of the major
98 porin OprF (Bouffartigues et al., 2015). Expression of OprF is controlled by AlgU (Firoved et
99 al., 2002) and SigX (Brinkman et al., 1999), and a mutant lacking OprF shows increased
100 expression and activity of SigX in addition to AlgU (Bouffartigues et al., 2015). SigX is
101 activated in response to membrane-affecting agents, such as hypo-osmolarity (Bouffartigues et
102 al., 2012; Blanka et al., 2014), high sucrose concentration (Bouffartigues et al., 2014), and cold
103 shock treatment (Bouffartigues et al., 2019, submitted). Because SigX is involved in *de novo*
104 fatty acids biosynthesis (Boechat et al., 2013; Flechard et al., 2018), SigX activity affects
105 membrane homeostasis (Duchesne et al., 2013; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014) and
106 membrane fluidity (Boechat et al., 2013; Chevalier et al., 2019; Flechard et al., 2018). In
107 addition to controlling and maintaining peptidoglycan and membrane homeostasis, AlgU and
108 SigX are master regulators that are involved in motility, biofilm formation and virulence in *P.*
109 *aeruginosa* (Chevalier et al., 2019).

110 The aim of this study was to get further insights into the effects of a Pf4 filamentous
111 phage variant infection on *P. aeruginosa* physiology. Herein, the addition of the superinfective
112 Pf4 variant to *P. aeruginosa* H103 strain resulted in a partial cell lysis phenotype, abrogated
113 twitching motility, increased c-di-GMP level and enhanced expression level of genes involved
114 in the biosynthesis pathways of two matrix exopolysaccharides (Pel and alginate). Accordingly,
115 biofilm formation was altered in static and dynamic conditions. Interestingly, Pf4 infection
116 caused an elongated cell morphology phenotype in the latter condition, suggesting a link
117 between flow-related forces and filamentation under Pf4 phage variant treatment. Moreover,
118 the SOS response pathway and the CESR mediated by the AlgU and SigX ECF σ factors were
119 enhanced in response to Pf4 variant infection, suggesting a link between the regulation of the
120 cell shape and the reorganization of cytoskeletal-like structures in this condition.

121

122

123 MATERIAL AND METHODS

124 **Bacterial strains, media, and growth conditions.** Bacterial strains used in this study are listed
125 in Supplementary Table S1. For planktonic cultures, bacteria were inoculated in LB medium
126 (50 mM NaCl) at an initial absorbance at 580nm ($A_{580\text{nm}}$) of 0.08. Bacteria were grown at 37°C
127 with orbital shaking at 180 r.p.m for 5h (wild-type) or 7h (Pf4-T). For infection experiments,
128 Pf4 and LUZ19 phages (Lammens et al., 2009), were added to the planktonic cultures at 1.5×10^9
129 and 1×10^9 phages.mL⁻¹ (final concentration), respectively. Pf4 phages were added at the
130 beginning of cultures for all experiments and LUZ19 phages, when used, were added at the
131 middle of exponential growth. For co-infection experiments, Pf4 phages was added at the
132 beginning of the culture, and LUZ19 phages were added after 3h of growth (end of the
133 exponential growth). All experiments were performed independently at least four times.

134
135 **Pf4 phages production.** A library of *P. aeruginosa* H103 mutants was created by random
136 transposon mutagenesis to study the transcriptional regulation of *sigX* (data not shown). The
137 mini-CTX-lux plasmid with the promoter region of *sigX* was integrated on *attB* site in *P.*
138 *aeruginosa* H103 to get the dH103 strain (Supplementary Table S1). The screening of the
139 library allowed the identification of dH103Pf4⁺ mutant (Supplementary Table S1) which
140 displayed a partial cell lysis phenotype and overproducing Pf4 phages. To obtain Pf4 phages,
141 the mutant dH103Pf4⁺ was grown for 24h at 37°C, then 1 mL of the planktonic culture was
142 harvested and centrifuged at 8,000 x g for 5 min. The supernatant was next filtered using a 0.22
143 µm pore size filter and stored at 4 °C until use.

144
145 **Numeration of Pf4 phages by double agar overlay plaque assay.** The double agar overlay
146 plaque assay was performed as previously described (Kropinski et al., 2009) with some
147 modifications. Briefly, the bottom agar was prepared by adding 15 g.L⁻¹ technical agar (BD,
148 United States) to LB broth medium, sterilized and dispensed in Petri dish plates. The top agar
149 was prepared by dissolving 6 g.L⁻¹ noble agar (BD, United States) in distilled water, sterilized
150 and hold at 60 °C in a water bath. Pf4 phages from the stock solution were diluted by tenfold
151 serial dilution in LB broth medium. Then, 10 µL of each dilution and planktonic cultures used
152 as receptor strains adjusted at $A_{580\text{nm}} = 0.1$ were added to 5 mL of top agar. The overlay mixture
153 was next dispensed on the bottom agar and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. A
154 supernatant stock solution obtained from planktonic cultures of H103 strain following the same

155 protocol as described above (see Pf4 phages production section) was used as a control
156 condition.

157

158 **Quantitative reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR) analyses.** Total RNAs from
159 non-treated and treated Pf4 or LUZ19 phages cultures were extracted using the hot acid-phenol
160 method (Bouffartigues et al., 2012). Genomic DNA contamination was removed from total
161 RNAs by using rigorous treatment with RNA-free Turbo DNaseI kit (Invitrogen, United States)
162 following manufacturer's instructions. The concentration of RNAs was determined using the
163 NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, United States) and their
164 quality was checked on an agarose gel (2%). RNAs were converted to cDNA using the High-
165 Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, United States) according to
166 manufacturer's instructions. Quantitative PCR reactions were carried out using SYBR Green
167 PCR Master Mix™ 335 (Applied Biosystems, United States) in an ABI 7500 Fast Q-PCR
168 system (Applied Biosystems, United States). All primers used in this study were designed with
169 Primer3 plus software (Supplementary Table S2) and were chemically synthesized and purified
170 by Eurogentec (Liège, Belgium). The mRNAs expression levels were calculated by comparing
171 the threshold cycles (Ct) of target genes with those of control sample groups. The relative
172 quantification data was determined with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using Microsoft-excel based
173 spreadsheet.

174

175 **Twitching motility.** Planktonic cultures of H103 and treated with Pf4 phage grown in LB
176 medium were assayed for twitching motility. An aliquot of 5 μ L diluted to an A_{580nm} of 0.1 was
177 used to inoculate the semi-solid LB medium agar plates (1 % agar; w/v) underneath the agar
178 layer. After 48 h of incubation at 37 °C, the agar was removed and the bacterial cells that
179 adhered to the Petri dish were stained with 0.4 % crystal violet for 15 min and washed with
180 distilled water. Then, representative pictures were taken.

181

182 **Biofilm culture.** Biofilm formation under static conditions was performed in 24-wells plates
183 with flat glass bottoms (Greiner Bio-One, Germany). Bacterial cells of H103 strain were
184 harvested from overnight cultures by centrifugation (7,500 x g, 5 min) and washed twice with
185 sterile physiological solution (9 g.L⁻¹ NaCl). Prior biofilm formation, an adhesion step was
186 carried out by inoculating each well with a bacterial suspension adjusted to an A_{580nm} of 0.1 in
187 sterile physiological solution for 2 h at 37 °C. Non-adhered planktonic cells were then removed
188 and LB medium at 50 mM NaCl with or without Pf4 phages was added and biofilm cultures

189 were grown at 37 °C for 22 h. Biofilms were washed twice by sterile physiological solution.
190 Biofilm formation was also performed under hydrodynamic conditions, as described by
191 Rodrigues et al., 2015 (Rodrigues et al., 2015), in a three-channel flow cell with individual
192 channel dimensions of 1 mm x 4 mm x 40 mm (Biocentrum, Denmark) (Pamp et al., 2009),
193 using a microscope glass coverslip (24x50 KnittelGlasser, Germany) as a substratum. The flow
194 system was prepared and sterilized as previously described (Tolker-Nielsen and Sternberg,
195 2011). Briefly, sterilization was performed by 0.5 % sodium hypochlorite for 30 min and rinsed
196 overnight by sterile physiological solution using a 250S Watson Marlow peristaltic pump.
197 Bacteria were harvested from overnight culture by centrifugation (7500 x g, 5min), washed
198 twice with sterile physiological solution and adjusted at $A_{580\text{nm}} = 0.1$. Bacteria were allowed to
199 adhere for 2h at 37°C without flow. Then, LB medium at 50 mM NaCl with or without Pf4
200 phages was then pumped with a 2.5 mL.h⁻¹ flow during 22 h at 37 °C.

201
202 **Confocal laser scanning microscopy (CLSM).** Prior to CLSM examination, bacteria were
203 stained with 5 µM of SYTO9 Green 5 dye (Invitrogen, United States) for 15 min. Static biofilms
204 were then washed twice with sterile physiological solution and dynamic biofilms were rinsed
205 for additional 10 min with a flow of medium. Biofilms were observed with a Zeiss LSM710
206 microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany) using a 40x oil immersion objective. SYTO9
207 was excited at 488nm and fluorescence emission was detected from 500 to 550 nm. Images
208 were recorded every micrometer, visualized and processed using the Zen 2.1 SP1 software (Carl
209 Zeiss Microscopy, Germany). Quantitative analyses of 3D images (thicknesses and
210 biovolumes) were performed using COMSTAT2 software (<http://www.imageanalysis.dk/>)
211 (Heydorn et al., 2000; Vorregaard, 2008). At least three images stacks from each of four
212 independent experiments (twelve stacks in total) were used for each analysis.

213
214 **Transmission Electron Microscopy (TEM).** Bacteria were harvested by centrifugation (8,000
215 x g, 2 min, 4°C) from cultures (H103 and Pf4-T). Bacteria were then fixed for 1 h with 2.5%
216 glutaraldehyde in 1M phosphate buffer, pH 7.1. After washing with PBS, bacterial cells were
217 post-fixed for 45 min in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. Dehydration was carried
218 out using successive incubations of increasing ethanol concentrations (from 70% to 100%).
219 Bacteria were then resuspended in 100% ethanol and centrifuged at 8,000 x g for 10 min. The
220 bacterial pellet was included in epon resin and after 24 h of polymerization, 70 nm sections
221 were cut using an ultramicrotome UC6 (Leica). Uranyl acetate (2% in 70% ethanol) and lead

222 citrate were used as contrasting agents for electron microscopy (JEOL 1010 à 80 KV). TEM on
223 bacteria was recorded using Olympus digital camera Quemesa with Item software.

224
225 **c-di-GMP quantification.** c-di-GMP levels were quantified by LC-MS/MS (Bouffartigues et
226 al., 2015; Strehmel et al., 2015). Briefly, H103 cells and treated with Pf4 phage (Pf4-T) were
227 harvested, centrifuged (8,000 x g, 2 min, 4°C), and washed in sterile physiological solution (0.9
228 g.L⁻¹ NaCl). Then, bacterial pellets were resuspended in the extraction buffer (acetonitrile /
229 methanol / ultrapure water (2V / 2V / 1V)) and incubated 15 min on ice. Next, bacteria were
230 lysed at 95°C for 10 min and centrifuged at 20,000 x g for 5 min at 4°C. The supernatants were
231 conserved on ice and the extraction was repeated twice. All supernatants were pooled together
232 and evaporated at 43°C during 24h. After resuspension in 400 µL of ultrapure water, the
233 samples were subjected to direct quantification by LC-MS/MS.

234
235 **Membrane fluidity assays by fluorescence anisotropy.** Fluorescence anisotropy
236 measurements were performed as previously described (Baysse et al., 2005). *P. aeruginosa*
237 H103 cells and treated with Pf4 phage (Pf4-T) were harvested by centrifugation (8,000 x g),
238 washed twice in sterile Tris/HCl buffer (15 mM, pH 7), and resuspended in the same buffer to
239 reach an A_{580nm} = 0.2. Then, 1 µL of a 4 mM of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, Sigma
240 Aldrich) stock solution in tetrahydrofuran was added to 1 mL aliquot of the resuspended cells
241 and incubated in the dark for 30 min at 37 °C to allow the probe to incorporate into the
242 cytoplasmic membrane. Further, anisotropy measurements were performed using the Spark[®]
243 20M multimode microplate reader (Tecan, Switzerland). The relationship between anisotropy
244 and membrane fluidity is an inverse one, where decreasing anisotropy values correspond to a
245 more fluid membrane and vice versa.

246
247 **Pf4 prophage region sequencing.** Bacterial DNA was extracted from dH103Pf4⁺ overnight
248 culture using GeneJet Genomic DNA extraction kit (ThermoScientific, Waltham,
249 Massachusetts, United States). Genomic library for whole genome sequencing was prepared
250 using the Nextera[™] XT DNA library prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing
251 was performed on an Illumina MiSeq platform (LMSM Evreux, Rouen Normandy University,
252 France) using a paired-end protocol (2 × 250 bp).

253 Default parameters were used except where otherwise noted. Raw paired-end reads were
254 trimmed using Trimmomatic v.0.36 (Bolger et al., 2014). Sequence data quality was checked
255 using FastQC v.0.11.6 (Wingett and Andrews, 2018). Assembly of trimmed paired-end reads

256 was done *de novo* using Unicycler v.0.4.7 (Wick et al., 2017). The obtained draft was checked
257 for consistency, e.g. the number of contigs, G+C content and total size of assembly, using Quast
258 v.5.0.0 (Mikheenko et al., 2018).

259 The extracted phage sequence (Genbank accession number: GCA_000006765.1) was mapped
260 to the trimmed raw reads with BBmap v38.69 from BBTools package (Bushnell et al., 2017).
261 Mapped reads in SAM format were converted into fastq files using SamToFastq command in
262 Picard (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). The obtained reads covering the phage region
263 were mapped to the PAO1 reference genome using Snippy v.4.3.6
264 (<https://github.com/tseemann/snippy>) to detected SNPs or deletions, and assembled into contigs
265 as described above.

266

267 **Promoter research.** Promoters upstream *mreB* gene were predicted with BPROM
268 (www.softberry.com) and by visual inspection, from *P. aeruginosa* PAO1 genome
269 (www.pseudomonas.com).

270

271 **Statistical analyzes.** The data were statistically analyzed using two-samples unpaired (for
272 dH103 and dH103Pf4⁺ analysis) and paired two-tailed *t*-test to calculate *p* values with
273 GraphPad Prism (GraphPad Prism version 4.0; GraphPad Software, San Diego, California,
274 USA). All values are reported and plotted as means with SEM of at least triplicate analyses for
275 each experimental variable. ^{NS} (Not significant); *p* > 0.05; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* <
276 0.001; **** *p* < 0.0001.

277 **RESULTS and DISCUSSION**

278

279 **Production of superinfective Pf4 phages under planktonic culture conditions**

280 The screening of a transposon mutant library generated for another purpose (data not shown)
281 led to the identification of dH103Pf4⁺, a transposon mutant from dH103 (see materials and
282 methods section) displaying a colony lysis phenotype (Figure 1A). Genome sequencing of this
283 mutant revealed numerous mutations, most of which are silent (Figure 1B, in blue), mostly
284 substitutions in PA0723 (*coaB*), PA0724 and PA0725, as well as a deletion in PA0724, in the
285 Pf4 prophage encoding region (Figure 1B, Supplementary Figure S1). Only few substitutions
286 in PA0724 led to an amino acid change, and the codon deletion resulted in an amino acid
287 deletion (Figure 1B, in red; Table S3). Mutations in the genomic region encoding Pf4 prophage
288 (PA0715-PA0729) are quite common in biofilm-grown *P. aeruginosa*, since these phages
289 (qualified as superinfectives) are suggested to contribute to biofilm development and variant
290 formation (Webb et al., 2003; Webb et al., 2004; Rice et al., 2009). However, to date, most of
291 the described mutations have been localized in the *pf4r* gene or in the intergenic region between
292 *pf4r* and *xisF4* (both genes in the intergenic region between PA0716 and PA0717). While Pf4r
293 confers immunity to Pf4 by repressing the lytic cycle activation, *xisF4* product was recently
294 identified as an excisionase promoting phage excision and activating phage replication,
295 controlling the lysis-lysogeny switch of Pf4 prophages (Li et al., 2019). Moreover,
296 superinfective Pf4 variant are able to form plaques on the wild-type host, which is otherwise
297 resistant to reinfection by the non-superinfective phages (Rice et al., 2009). Accordingly, the
298 Pf4 variant isolated in the current study was able to induce lysis on its host colonies (Figure
299 1C) and affected the growth of its host since the generation time was increased from 37 min for
300 dH103 to 57 min for dH103Pf4⁺ (Figure 1D). A phage titer of about 4×10^{10} PFU.mL⁻¹ was
301 determined after 24 h of growth, which is in agreement with a previous study (Webb et al.,
302 2003). Overexpression of PA0717 by more than 1,000-fold in dH103Pf4⁺ suggests Pf4
303 overproduction either from Pf4 multiplication/expression and/or from prophage expression
304 (Figure 1E). To our knowledge, this is the first report of a superinfective Pf4 phage that was
305 obtained from a planktonic and not from a biofilm culture. This Pf4 phage variant was used in
306 the subsequent assays to study the effects of Pf4 infection on *P. aeruginosa* H103 physiology.

307

308 **H103 infection by the superinfective Pf4 variant**

309 *P. aeruginosa* H103 infection was performed by adding 1.5×10^9 Pf4 PFU.mL⁻¹ at the beginning
310 of the bacterial culture. As shown in Figure 2A, growth of Pf4-treated (Pf4-T) H103 was

311 affected compared to H103, since the generation time was increased from 37 min (H103) to 55
312 min (Pf4-T), in line with to the data observed for dH103 and dH103Pf4⁺ strains (compare
313 Figures 2A and 1D). When plated on LB agar medium, Pf4-T H103 displayed an altered colony
314 morphology phenotype, similar to the one of the dH103Pf4⁺ superinfective Pf4-phage
315 producing strain (Figures 1A and 2B). Moreover, Pf4 phage variant was able to form lysis
316 plaques on *P. aeruginosa* H103 (Figure 2C). This result was quite surprising since the Pf4 phage
317 was previously shown to be unable to form lysis plaques on the wild-type PAO1 carrying the
318 Pf4 prophage, while readily forming plaques when the prophage is deleted from the genome
319 (Rice et al., 2009). These data suggest that the Pf4 phage variant produced by dH103Pf4⁺ is
320 also superinfective for the wild-type strain. The presence of phages particles was further
321 confirmed by transmission electron microscopy (Figure 2D). Consistently, expression of the
322 PA0717 gene showed a huge increase of about 20,000-fold when *P. aeruginosa* was infected
323 by Pf4 (Figure 2E), suggesting an active Pf4 replication in H103 strain. Twitching motility,
324 which relies on functional TFP, was totally abrogated in Pf4-T condition (Figure 2F), in
325 agreement with previous reports suggesting that this phenotype was related to Pf4 phages
326 fixation on their receptors leading to loss of their functionalities (Secor et al., 2017). Altogether,
327 these data show that H103 infection by Pf4 phage variant resulted in a colony-lysis phenotype
328 resembling that of the Pf4 superinfective phage variant overproducing strain dH103Pf4⁺, which
329 could overcome *P. aeruginosa* natural resistance to infection.

330

331 **Pf4 variant infection affects biofilm architecture and cell morphology, and increases SOS stress** 332 **response**

333 So far, most studies have focused on mature biofilms, at least partly because such conditions
334 were found to produce the superinfective Pf4 form (Hui et al., 2014). Herein, the effect of Pf4
335 phage variant on *P. aeruginosa* H103 premature biofilm development was assessed using
336 confocal laser scanning microscopy (CLSM) under both static (Figure 3A) and dynamic (flow
337 cell, Figure 3B) conditions after 24h of growth. *P. aeruginosa* H103 biofilm grown in static
338 condition displayed some mushroom-like structures (Figure 3A). Addition of Pf4 at the onset
339 of the biofilm culture increase the number of these structures, which appeared however smaller
340 and scattered. COMSTAT image analyses indicated that Pf4-T condition led to slightly higher
341 maximal and average thickness, while the biofilm biovolume was not strongly affected
342 compared to H103 (Figure 3A). Under dynamic flow conditions (2.5 mL.h⁻¹), *P. aeruginosa*
343 H103 displayed a flat and homogeneous biofilm architecture, mainly devoid of mushroom-like
344 structures, with maximal and average thickness that were lower than when grown in static

345 condition (Figure 3B). Noticeably, some bacteria were found to form chains, suggesting active
346 multiplication of the resident bacteria that may remain closely associated. Since such phenotype
347 was not observed in static conditions, one can assume that it may result from the medium flow
348 condition. Remarkably, the adding of Pf4 superinfective phages resulted in increased biofilm
349 biovolume and both maximal and average thickness. Moreover, the cell morphology was
350 strongly altered, since numerous single and extremely elongated thin cells were observed,
351 reaching for some of them, more than 40 μm length. These filamentous structures were mostly
352 located within the flat biofilm structure (Figure 3B). However, some rare microcolonies were
353 observed, in which bacteria were displaying conventional length (1 to 2 μm), while the cells
354 surrounding the mushroom-like structures were for most of them extremely elongated (Figure
355 3C). The results indicate that filamentation/elongated H103 cell phenotype can be associated
356 mainly to the presence of Pf4 phage variant, under flow-related forces. The bacteria that form
357 chains in the untreated condition may be due to the flow-related forces if comparing with the
358 static conditions. A similar elongated-cell phenotype has been previously reported in response
359 to major stresses, such as exposure to sub-minimal inhibitory concentrations of numerous
360 antibiotics, including beta-lactams (Kondo and Satoh, 1995) or ciprofloxacin (CIP) (Justice et
361 al., 2008).

362 Contrary to the previous belief that filamentous cells represent severely sick and dying members
363 of bacterial populations, it has been shown that different pathogenic bacteria, such as
364 uropathogenic *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Legionella pneumophila*,
365 employ filamentation as a survival strategy under harsh conditions (Justice et al., 2008).
366 Moreover, the filaments could provide an environmental niche favoring mutagenesis (Bos et
367 al., 2015; Zaborskyte et al., 2017). In *E. coli* (Bos et al., 2015) or *P. aeruginosa* (Breidenstein
368 et al., 2012), cell filamentation resulting upon exposure to CIP sub-inhibitory concentrations
369 was shown to be induced by the SOS response. Since filamentation was observed in response
370 to Pf4 treatment under flow condition, we suspected an activation of the SOS response upon
371 Pf4 exposure. Indeed, expression of *recA*, *lexA*, *uvrA* and *uvrC*, involved in the SOS response,
372 was increased in planktonic conditions when H103 was infected by Pf4 (Figure 4). In *P.*
373 *aeruginosa*, the ATP-dependent Lon protease (PA1803) plays a major role in regulating the
374 SOS response since *lon* mutant exhibit extreme filamentation and susceptibility to CIP
375 (Breidenstein et al., 2012). In addition, the Lon-control of the SOS response occurs via the
376 action of SulA (Justice et al., 2008; Breidenstein et al., 2012), which was shown to inhibit the
377 cell division by sequestration of the tubulin homologue FtsZ (Chen et al., 2012), a major
378 cytoskeletal actor involved in cell division (Erickson et al., 2010). In response to Pf4 treatment,

379 *lon* transcription was not affected, while *sulA* expression was increased by about 30-fold and
380 *ftsZ* was decreased by about 2-fold (Figure 4). Altogether, these data suggest that Pf4 infection
381 induces biofilm formation in *P. aeruginosa* by altering the architecture and cell morphology
382 leading to the filamentation phenotype probably through the activation of the SOS response.
383 Noticeably, this pathway was previously shown to be activated by single stranded DNA
384 (Baharoglu and Mazel, 2014), accordingly to the high level of single stranded Pf4 DNA that
385 we reported above.

386

387 **Increased matrix-encoding genes expression and c-di-GMP production in response to Pf4** 388 **variant infection**

389 The *P. aeruginosa* PAO1 biofilm matrix contains mainly three exopolysaccharides (EPS), Pel
390 and Psl, which form a scaffold that maintains biofilm structure (Colvin et al., 2012), and
391 alginate, which is layered on top of this foundation to serve as a protective barrier (Yang et al.,
392 2012). Pel is a *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc)- and *N*-acetyl galactosamine (GalNAc)-rich
393 polysaccharide that is charged under slightly acidic pH and interacts with eDNA within the
394 matrix (Jennings et al., 2015). Psl is composed of a neutral penta-saccharide subunit that
395 contains mannose, rhamnose, and glucose in a 3:1:1 molar ratio (Ma et al., 2007). Alginate is a
396 random linear polymer of mannuronic and guluronic acids (Tan et al., 2014). Since it has been
397 previously shown that biofilm architecture was closely related to the EPS produced by *P.*
398 *aeruginosa* (Chew et al., 2014), we evaluated the expression of the three EPS-encoding operons
399 by RT-qPCR. In response to Pf4 infection, expression of *pelB* and *algD* were strongly increased
400 by about 53.7 and 39.3-fold, respectively, while transcription of *pslB* was reduced by 4.5-fold
401 (Figure 5A). It is recognized that AmrZ and FleQ are major regulators involved in EPS
402 production (Maunder and Welch, 2017). It has been shown that the alginate and motility
403 regulator AmrZ promotes *pelB* and *algD* transcription (Baynham and Wozniak, 1996; Baynham
404 et al., 1999; Jones et al., 2014; Xu et al., 2016a; Xu et al., 2016b), while repressing *pslB*
405 expression (Jones et al., 2013). In addition, the master regulator of flagellar motility and
406 exopolysaccharides production FleQ favors *pelB* expression (Baraquet et al., 2012; Baraquet
407 and Harwood, 2016; Matsuyama et al., 2016). Based on all these data, we speculated that AmrZ
408 and FleQ expression and/or activity could be altered in the Pf4-T condition. Accordingly, *amrZ*
409 and *fleQ* transcription was increased by 2- and 2.1-fold, respectively, in response to Pf4
410 infection (Figure 5A). Thus, it is possible that the biofilm enhancement observed in the Pf4-T
411 condition was partly due to AmrZ transcriptional activity on *pelB*, *algD* and *pslB*, and of FleQ
412 on *pel* operon. FleQ is known to act on EPS production via its binding to the intracellular second

413 messenger bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) (Hickman and
414 Harwood, 2008). High c-di-GMP levels are correlated to increased cell aggregation, surface
415 attachment and biofilm formation in a variety of bacteria including *P. aeruginosa* (Romling and
416 Galperin, 2017), via regulating expression of genes encoding enzymes of the EPS biosynthetic
417 pathways (Baraquet et al., 2012; Whitney et al., 2015; Matsuyama et al., 2016; Baraquet and
418 Harwood, 2017). We therefore quantified c-di-GMP level and showed that infection by Pf4
419 resulted into a significant increase of c-di-GMP level (Figure 5B). Interestingly, the *cdrA* gene,
420 encoding a biofilm matrix protein (Borlee et al., 2010), is regulated by c-di-GMP and its
421 expression is therefore used as a c-di-GMP-level reporter (Rybtke et al., 2012). As shown in
422 Figure 5A, *cdrA* transcription was increased by 2-fold in response to Pf4 infection, supporting
423 our finding that c-di-GMP was overproduced in this condition. In addition, *cdrA* expression
424 was shown to be regulated by AmrZ (Jones et al., 2014; Xu et al., 2016a), and FleQ that binds
425 to c-di-GMP to promote *pelA* and *cdrA* expression (Matsuyama et al., 2016, Borlee et al., 2010).
426 Altogether, these data show that *P. aeruginosa* H103 infection by Pf4 phage variant resulted in
427 increased expression of genes involved in EPS production, at least via enhanced expression and
428 activity of AmrZ and FleQ in presence of high c-di-GMP level.

429

430 **Pf4 phage variant infection triggers an AlgU- and SigX- mediated cell envelope stress response**

431 Since infection by Pf4 relies on attachment of phage particles on *P. aeruginosa* TFP and
432 phage extrusion occurs across the cell envelope, we speculated that this phage-host interaction
433 might trigger a cell envelope stress and thus a CESR. In *P. aeruginosa*, CESR relies mainly on
434 the two ECF σ factors AlgU and SigX (Chevalier et al., 2019). To assay the involvement of
435 SigX in *P. aeruginosa* response to Pf4 infection, expression of *sigX* and some of its known
436 targets, i.e *cfrX*, *cmpX* and *fabY* were evaluated by RT-qPCR. Remarkably, expression of *sigX*
437 was strongly enhanced by 5.7-fold in response to Pf4 infection (Figure 6A). In addition,
438 expression of the SigX targets *cfrX*, *cmpX* and *fabY* were increased by 23.3, 28.0 and 5.1-fold,
439 respectively, in Pf4-T condition (Figure 6A). To our knowledge, this is the first study showing
440 such a high fold change in SigX expression and activity, since it is usually closer to a 2-fold
441 change in other inducing conditions such as low osmolarity, high sucrose concentration or
442 absence of OprF (Bouffartigues et al., 2012; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014;
443 Bouffartigues et al., 2014; Bouffartigues et al., 2015; Flechard et al., 2018). SigX is furthermore
444 involved in c-di-GMP metabolism through PA1181, PA2072 and *gcbA* (PA4843) expression
445 regulation (Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014; Bouffartigues et al., 2014; Bouffartigues
446 et al., 2015). As shown in Figure 6A, PA1181 and *gcbA* were up-regulated in Pf4T condition,

447 compared to H103. Since GcbA displays a diguanylate cyclase activity (Jones et al., 2014),
448 while PA1181 contains both GGDEF and EAL motifs, our data suggest that these two proteins
449 may be involved in the increased c-di-GMP level upon Pf4 infection. Interestingly, other growth
450 conditions (e.g., high sucrose concentration and absence of the major porin OprF), in which
451 SigX was active, were shown similarly to affect the expression of PA1181 and *gcbA*
452 (Bouffartigues et al., 2014; Bos et al., 2015), suggesting that the CESR encountered by *P.*
453 *aeruginosa* would be similar in these three conditions. Noticeably, *amrZ* was recently shown
454 to be part of the SigX regulon (Bouffartigues et al., submitted) and its expression was increased,
455 as well as SigX expression and activity in response to Pf4 infection. However, AmrZ was also
456 described to be a repressor of *gcbA* transcription (Jones et al., 2014). This suggests that SigX
457 could bypass AmrZ-dependent *gcbA* repression by a mechanism that requires to be unraveled
458 by further studies.

459 SigX has also been reported to be involved modulation of membrane fluidity through the
460 regulation of fatty acid biosynthesis, resulting in changes in the cell membrane phospholipids
461 composition in order to maintain envelope integrity (Boechat et al., 2013; Duchesne et al., 2013;
462 Blanka et al., 2014; Flechard et al., 2018). To evaluate *P. aeruginosa* membrane fluidity post
463 Pf4 infection, fluorescence anisotropy (FA) measurements using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
464 (DPH) fluorescent probe were performed. As shown in Figure 6B, FA values decreased when
465 *P. aeruginosa* was infected with Pf4 phage variant, compared to H103, revealing increased
466 membrane fluidity. Altogether, these data indicate that Pf4 infection increases membrane
467 fluidity probably because of the strong activity of SigX.

468 We next assayed expression and activity of the second major actor involved in *P. aeruginosa*
469 CESR, the ECF σ factor AlgU. AlgU controls a large regulon of more than 300 genes, including
470 noticeably *algU* itself, *algD*, *algR*, *cmaX* and *amrZ* (Schulz et al., 2015; Chevalier et al., 2019).
471 Infection by Pf4 resulted in strong expression and activity of AlgU [see Figure 5A (for *amrZ*)
472 and Figure 7A (for *algU*, *algD*, *algR* and *cmaX*)], as it was the case for SigX. The transcriptional
473 regulator AlgR is involved in the expression of *algD* as well as *mucR* that encodes for a
474 diguanylate cyclase (Kong et al., 2015). In the current study, we observed that *mucR* expression
475 was increased by 5-fold in response to Pf4 infection, suggesting that MucR could also
476 contribute to the increased c-di-GMP level observed in *P. aeruginosa* after Pf4 infection.

477 Interestingly, the *mreB* gene, encoding an actin-like protein responsible of maintaining
478 bacterial shape in many bacteria (Wachi and Matsushashi, 1989), was previously suggested to
479 belong to AlgU regulon (Schulz et al., 2015). By visual inspection of the *mreB* upstream gene
480 sequence, an AlgU-dependent promoter was found based on the previously described consensus

481 sequence (Firoved et al., 2002) (Figure 7B). Noticeably, *mreB* was overexpressed by 13-fold in
482 response to Pf4 treatment (Figure 7A), while slightly but not significantly decreased in an *algU*
483 mutant, indicating that AlgU might act as an activator of *mreB* expression (Figure 7C).
484 Moreover, a putative σ^{70} -dependent promoter was found via BPROM upstream of the AlgU
485 promoter (Figure 7B), which could explain the basal expression of *mreB* in the *algU* mutant
486 (Figure 7C). Since overexpression of MreB confers a filamentous phenotype, due to the
487 inhibition of cell division (Kruse et al., 2003), it is possible that an increased AlgU activity
488 could at least partly result in the filamentous phenotype that we observed in Pf4-T condition
489 biofilms (Figure 3B).

490 Finally, to further confirm the involvement of SigX and AlgU in *P. aeruginosa* H103
491 response to Pf4 infection, expression and activity of both SigX and AlgU were determined in
492 the two ECF σ factors deletion mutants treated by Pf4. As expected, no gene expression
493 difference could be observed when comparing Pf4-T to non-treated mutant strains
494 (Supplementary Figure S2A), confirming that both SigX and AlgU are involved in the observed
495 Pf4-induced phenotypes. However, the signal resulting from Pf4 infection leading to their
496 activity is still unknown. One possibility resides into the fact that both strains are altered in their
497 TFP production and/or activity (Bazire et al., 2005; Gicquel et al., 2013). Since TFP are Pf4
498 receptors (Castang and Dove, 2012), their absence or their inactivity could explain the absence
499 of twitching motility and Pf4-induced lysis plaques (Supplementary Figure S2B). To get further
500 insights into the response to Pf4 filamentous phage infection, we infected *P. aeruginosa* H103
501 with LUZ19, a virulent TFP-mediated phage (Lammens et al., 2009). After 20 min of infection,
502 corresponding to the very early entry into the lytic phase (before cell lysis, Supplementary
503 Figure S3A), RNAs were extracted and expression of *sigX*, *algU* and some of their targets was
504 investigated. Even if expression of *sigX* and its targets were slightly reduced when *P.*
505 *aeruginosa* was infected with LUZ19, no significant difference of expression or activity was
506 observed for both ECF σ factors (Supplementary Figure S3B), suggesting that the CESR
507 mediated by SigX and AlgU may specifically rely on Pf4 filamentous phage infection. In
508 addition, when the cells were first infected with Pf4 variant and further with LUZ19 phages, a
509 reduced lysis phenotype was observed (Supplementary Figure S3C), as expected since the two
510 phages share the same TFP receptors. Altogether, our data suggest that phage-host interaction
511 via TFP is required but not sufficient to generate a CESR. Otherwise, it remains plausible that
512 the CESR was not activated after 20 min of infection.

513

514 **Concluding remarks**

515 We show herein that Pf4 filamentous phage infection results in two major stress responses, i.e.
516 the SOS response leading to elongated cell, and an extensive CESR, mediated by the two major
517 ECF σ factors SigX and AlgU. Our data are summarized in Figure 8. Drastic phenotypes were
518 observed in response to Pf4 infection at the level of the cell, as increased membrane fluidity
519 related to SigX hyperactivity, and altered cell morphology linked most likely to induction of
520 the SOS response and AlgU activity. This first set of data raised the question of the relationship
521 between the membrane fluidity and the bacterial cytoskeleton. Intriguingly, *in vivo* observations
522 using specific lipid-binding dyes showed that the membrane assembly of the actin-homologue
523 MreB filaments with the membrane generates fluid lipid domains and promotes movements of
524 membrane proteins and lipids (Strahl et al., 2014), similar to actin in cortical cytoskeleton of
525 eukaryotes (Chichili and Rodgers, 2009). In addition, MreB mislocalization induces formation
526 of membrane invaginations enriched in high fluidity domains (Govindarajan and Amster-
527 Choder, 2017). Based on these data, the increased production of MreB could generate a major
528 stress leading to SigX hyperactivity and increased membrane fluidity. In addition to these
529 important observed cellular phenotypes, Pf4 variant infection resulted also in increased biofilm
530 formation and c-di-GMP production, at least partly via the activity of both AlgU and SigX. The
531 question relies now on the molecular mechanisms leading Pf4 phages to induce SigX and AlgU
532 activities. Since TFP are known as Pf4 phage receptors, and are able to act as mechano-sensors
533 that signal through the Chp chemosensory system (Persat et al., 2015), it may be conceivable
534 that the Chp/TFP/Vfr pathway would be affected by Pf4 variant phage infection.

535

536 ACKNOWLEDGMENTS

537 The LMSM is supported by the Région Normandie (France), Evreux Portes de Normandie
538 (France) and European FEDER funds. D.T and A.D. are supported by doctoral fellowships from
539 the Région Normandie (France), and M.C from the French ministry (MENRT). A.T., A.M.B.
540 and S.R. are supported by post-doctoral fellowships from European Union (FEDER) and
541 Région Normandie (France). O.C.A. is a recipient of a postgraduate fellowship from Campus
542 France and FUNAI (Nigeria). M.N. and G.B.W. acknowledge support from the Helmholtz
543 program BioInterfaces in Technology and Medicine (BIFTM) of KIT. The funders had no role
544 in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit this work for
545 publication. We thank Prof. Rob Lavigne and Jeroen Wagemans (KU Leuven, Belgium) for the
546 gift of LUZ19 virulent phage.

547 **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

548 The authors declare no conflict of interest.

549

In review

550 **AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT**

551 E.B., S.C., D.T. designed the experiments. D.T. M.C, A.T., E.B., S.R., J.V., E.Be, O.M., A.D.,

552 O.C.A., G.B-W., M.N., A.M.B, S.C conducted experiments and analyzed the data. E.B., S.C.,

553 P.C., D.T., O.L., A.T., M.F. and N.O. contributed to the writing of the manuscript.

In review

554 **FIGURE LEGENDS**555 **Figure 1. Isolation and description of a Pf4 phage superinfective variant.**

556 A. Colony morphology of *P. aeruginosa* dH103 and dH103Pf4⁺ strains. B. Genes mapping of
 557 the *coaB*-PA0725 Pf4 prophage region in dH103Pf4⁺ with mutations compared to H103. Silent
 558 mutations are represented in blue. Mutations and deletion are represented in red. C. Lysis plaque
 559 assay using supernatant of dH103 and dH103Pf4⁺ performed on H103 strain. D. Growth curves
 560 of dH103 and dH103Pf4⁺. E. Relative mRNA levels of PA0717 in dH103 (blue bar) and
 561 dH103Pf4⁺ (orange bar) ± SEM as determined by RT-qPCR experiments. Lysis plaques, growth
 562 and RT-qPCR experiments were assayed at least four times independently. Statistics were
 563 achieved by unpaired (two samples) two-tailed *t*-test. ** *p* < 0.01.

564

565 **Figure 2. Effect of Pf4 phage variant on *P. aeruginosa* H103 strain.**

566 A. Growth curves of H103 control strain and Pf4-treated H103 (Pf4-T). B. Colony morphology
 567 of H103 and Pf4-T. C. Lysis plaque assay using supernatants of H103 and Pf4-T strains
 568 performed on H103. D. Visualization of Pf4 phage variant by transmission electron microscopy.
 569 E. Relative mRNA levels of PA0717 in H103 (green bar) and Pf4-T (violet bar) ± SEM as
 570 determined by RT-qPCR experiments. F. Twitching motility of *P. aeruginosa* H103 treated or
 571 not by Pf4 phages. Growth, lysis plaques, twitching motility and RT-qPCR experiments were
 572 assayed at least four times independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two
 573 tailed *t*-test. **** *p* < 0.0001.

574

575 **Figure 3. Pf4 phage variant infection leads to altered biofilm architecture and cell**
576 **morphology.**

577 Side, top and three-dimensional views of 24h-old biofilm of H103 untreated and treated with
 578 Pf4 phage grown under static (A) and dynamic conditions (B, C), observed by CLSM. Cells
 579 were stained with SYTO9 green. Values represent COMSTAT2 image analysis. Results were
 580 given ± SEM of at least three independent experiments. C. Focus on microcolonies of the Pf4-
 581 T biofilm grown in dynamic condition. Each experiment was assayed at least four times
 582 independently.

583

584 **Figure 4. SOS response induction after Pf4 phage variant infection.** Relative mRNA
 585 expression levels of *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrC*, *lon*, *sulA* and *ftsZ* in H103 (green bars) and Pf4-T
 586 (violet bars) conditions ± SEM as determined by RT-qPCR experiments. Each experiment was

587 assayed at least four times independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-
 588 tailed *t*-test. ^{NS} $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

589

590 **Figure 5. c-di-GMP concentration and matrix-encoding genes expression increase after**
 591 **Pf4 phage variant treatment.**

592 A. Relative mRNA expression levels of *pelB*, *algD*, *pslB*, *amrZ*, *fleQ* and *cdrA* in H103 (green
 593 bars) and Pf4-T (violet bars) conditions as determined by RT-qPCR experiments. B. c-di-GMP
 594 quantification by LC-MS/MS in H103 (green bar) and Pf4-T conditions. Each experiment was
 595 assayed at least four times independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-
 596 tailed *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

597

598 **Figure 6. Pf4 phage variant infection triggers a strong SigX-mediated cell envelope stress**
 599 **response in H103 strain.**

600 A. Relative mRNA expression levels of *sigX*, *cfrX*, *cmpX*, *fabY*, PA1181, PA2072 and *gcbA* in
 601 H103 (green bars) and Pf4-T (violet bars) conditions as determined by RT-qPCR experiments.
 602 B. Membrane fluidity assessment by fluorescence anisotropy using DPH probe in H103 (green
 603 bar) and Pf4-T (violet bar) conditions. Each experiment was assayed at least four times
 604 independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-tailed *t*-test. ^{NS} $p > 0.05$;
 605 * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

606

607 **Figure 7. Pf4 phage variant infection leads to an AlgU-mediated cell envelope stress**
 608 **response in H103 strain.**

609 A. Relative mRNA expression of *algU*, *algD*, *algR*, *cmaX*, *mucR* and *mreB* in H103 (green
 610 bars) and Pf4-T (violet bars) conditions as determined by RT-qPCR experiments. B. Sequence
 611 of the DNA region upstream of *mreB* showing a predicted AlgU-dependent promoter and σ^{70} -
 612 dependant promoter. C. Relative mRNA expression levels of *mreB* in *P. aeruginosa* H103
 613 (green bar) and Δ *algU* (yellow bar) as determined by RT-qPCR experiments. Each experiment
 614 was assayed at least four times independently. Statistics were achieved by paired (two samples)
 615 two-tailed *t*-test. ^{NS} $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

616

617 **Figure 8. Pf4 phage variant infection altered *P. aeruginosa* H103 regulatory circuits and**
 618 **physiology.**

619 *P. aeruginosa* H103 infection by Pf4 phage variant leads to a SigX and AlgU-mediated cell
 620 envelope stress response. The activation of the SigX ECF σ factor triggers increased membrane

621 fluidity and increased gene expression of *gcbA* and PA1181 diguanylate cyclases, most likely
622 responsible of the c-di-GMP-increased concentration. The AlgU activation leads to increased
623 *algR* expression, which product is responsible for *mucR* increase, encoding another diguanylate
624 cyclase. The ECF σ factors AlgU and SigX modulate *amrZ* expression, which in turn controls
625 exopolysaccharides gene expression. The increased c-di-GMP concentration (according to *cdrA*
626 gene expression) and exopolysaccharides lead to a switch from planktonic to sessile lifestyles.
627 Pf4 phage variant treatment also leads to increased *mreB* expression and the induction of the
628 SOS response, which might be responsible for the observed filamentation phenotype. Thin
629 black full arrows or broken lines represent direct transcriptional regulation. Thin blue full arrow
630 or broken line indicates a direct regulation, but not at the transcriptional level. Thin grey arrow
631 represents the possible bypass of SigX in *gcbA* transcriptional AmrZ-dependent regulation.
632 Thin dashed arrow represents potential regulation of *mreB* gene expression by AlgU.

In review

633 SUPPLEMENTARY FIGURES

634

635 **Figure S1. *coaB*, PA0724 and PA0725 sequence alignment of Pf4-overproducing**
636 **dH103Pf4⁺ strain and PAO1 reference strain (www.pseudomonas.com, Winsor et al.,**
637 **2016).** Nucleotides highlighted in blue correspond to silent mutations, whereas mutations or
638 deletion are in red, compared with PAO1 reference sequence.

639

640 **Figure S2. $\Delta sigX$ and $\Delta algU$ mutants are resistant to Pf4 phage variant infection. A.**
641 Relative mRNA expression levels of *sigX*, *cfrX*, *cmpX*, *fabY*, *algU*, *algD* and *cmaX* in $\Delta algU$
642 and $\Delta sigX$ mutants treated by Pf4 phage variant (red bars) or not (blue bars) as determined by
643 RT-qPCR experiments. B. Plaque lysis assay and twitching motility in *P. aeruginosa* H103,
644 $\Delta algU$ and $\Delta sigX$ mutant strains treated or not by Pf4 phages. Each experiment was assayed at
645 least four times independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-tailed *t*-
646 test. ^{NS} $p > 0.05$.

647

648 **Figure S3. Cell envelope stress response is not induced by LUZ19 phage TFP-mediated**
649 **infection. A.** Growth curves of H103 (green curve) strain treated by Pf4 (violet curve) and
650 LUZ19 (grey curve) phages. B. Relative mRNA expression levels of *sigX*, *cfrX*, *cmpX*, *fabY*,
651 *algU*, *algD* and *cmaX* genes in *P. aeruginosa* H103 treated or not by LUZ19 phage as
652 determined by RT-qPCR experiments. C. Growth curves of H103 (green curve), H103 treated
653 by Pf4 (violet curve) or LUZ19 (grey curve) phages, and H103 treated first by Pf4 phage
654 followed by LUZ19 phage (black curve). Each experiment was assayed at least four times
655 independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-tailed *t*-test. ^{NS} $p > 0.05$.

656 SUPPLEMENTARY TABLES

657

658 **Table S1. Strains used in this study.**

Strains	Relevant characteristics	Sources
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
H103	Wild-type strain; prototroph derivative of PAO1	(Hancock and Carey, 1979)
$\Delta sigX$	H103 <i>sigX</i> deletion mutant	(Bouffartigues et al., 2012)
$\Delta algU$	H103 <i>algU</i> deletion mutant	Bouffartigues et al., 2019 (submitted)
dH103	H103 derivative strain with chromosomic insertion of Mini-CTX-Lux vector	This work
dH103Pf4 ⁺	dH103 overproducing Pf4 superinfective variant phage	This work

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678 **Table S2. Primers used in this study.**

679

PA number	Gene name	Primer name	Sequence (5' - 3')
PA0668.1	16SrRNA	16S-F	AACCTGGGAACTGCATCCAA
		16S-R	CTTCGCCACTGGTGTTCCTT
PA0717	PA0717	PA0717-F	CGTAGAGATTTGCACCTTCCA
		PA0717-R	ACAGCCACCAACTCTTCGAC
PA0762	<i>algU</i>	algU-F	CACGCCCTGAAGGACATC
		algU-R	CAAATCCTCGGGCAACTG
PA1097	<i>fleQ</i>	fleQ-F	CGCGAAGACCTCTACTACCG
		fleQ-R	CGAGATCAGTTCGTTGAGCA
PA1181	PA1181	PA1181-F	CCAGATGGAGAAGCGCTACCT
		PA1181-R	CGCTTGCGACTGTCGATATC
PA1727	<i>mucR</i>	mucR-F	CCACGAGCTGATGATCAATG
		mucR-R	TCGAACTCTCGAAGAAGCAG
PA1773	<i>cmaX</i>	cmaX-F	AAAGGGCCGAAGACAGCAT
		cmaX-R	CGCGATCGGTCAGGTAGTG
PA1774	<i>cfrX</i>	cfrX-F	CTGCGGGACCTGCTCAAG
		cfrX-R	GCCGACCTGGCGATTG
PA1775	<i>cmpX</i>	cmpX-F	TATCTGGACCCAGAGCTTGC
		cmpX-R	GAAGCCGAGCAGAACGAC
PA1776	<i>sigX</i>	sigX-F	AATTGATGCGGCGTTACCA
		sigX-R	CCAGGTAGCGGGCACAGA
PA1776	<i>sigX</i>	mut-sigX-F	TTGGCTCGTCCATGTCAATC
		mut-sigX-R	CATGATATCCGCTATCTCCTGAAA
PA1803	<i>lon</i>	lon-F	CAGTTGGGCAAGAAAGTCC
		lon-R	TGCTTCTGCTCGATCTTCAG
PA2072	PA2072	PA2072-F	CCAGGCATCAGGACGACAT
		PA2072-R	CGATTCTGCAGCGCCTTT
PA2232	<i>pslB</i>	pslB-F	ACACCAACGAATCCACCTTCA
		pslB-R	CGCTCTGTACCTCGATCATCAC
PA2585	<i>uvrC</i>	uvrC-F	AGGACAGCTATTTCCGCAAC
		uvrC-R	TTCCTTCGAGGAACATCACC

PA3007	<i>lexA</i>	lexA-F	AAGCCGAGATCCTCTCCTTC
		lexA-R	GACTTGAAGCCGAGTTCCTG
PA3008	<i>sulA</i>	sulA-F	GTGGTCAGTTGGCTGGAAC
		sulA-R	TATTCAGGCTCTGTGCTTGG
PA3063	<i>pelB</i>	pelB-F	CGGCTACGTGCAGCGTTAT
		pelB-R	CACTGCATGCGTTCCTTGAC
PA3385	<i>amrZ</i>	amrZ-F	CGTGAGCAGATCGCAGAA
		amrZ-R	GCTCGTGCAGGCTGAGTT
PA3540	<i>algD</i>	algD-F	GATGCTCGGTTTCGTTGATG
		algD-R	TCGTGGCTGGTGATGAGAT
PA3617	<i>recA</i>	recA-F	GTAACGCACTGAAGTTCTACGC
		recA-R	TGTTCTTCACCACCTTGACG
PA4234	<i>uvrA</i>	uvrA-F	ATCGTGATCACCGGTCTTTC
		uvrA-R	TCCATCATCGACAGGAAGT
PA4407	<i>ftsZ</i>	ftsZ-F	CATGAGCGAAATGGGCATGG
		ftsZ-R	AGGTTGACGTCTTCCAGCAG
PA4481	<i>mreB</i>	mreB-F	CAAGGTCCACGAGAACAGCT
		mreB-R	TTCGATCAGGAACACCTCGC
PA4625	<i>cdrA</i>	cdrA-F	GACGCCTACGTCAACAGTCA
		cdrA-R	GTTACCGGTGATCGCGTACT
PA4843	<i>gcbA</i>	gcbA-F	CCTGGGCACCGAATTGG
		gcbA-R	CGGCGGACAGGTAGATGATC
PA5174	<i>fabY</i>	PA5174-F	AGGGCGACCTGGAGATCAT
		PA5174-R	GCGCGTCCTTCTTGTATACCA
PA5261	<i>algR</i>	algR-F	TTGTTCGATGACGAACCTCTG
		algR-R	GTCCAGTTGCCCTACCAATC

680

681

682

683

684

685

686 **Table S3. SNPs and deletion identified in PA0724 protein sequence from dH103Pf4+**
687 **strain.**

688

Effect	PAO1 position	Nucleotide change	Amino-acid change
Missens	791929-791930	AT>GC	Asn187Ser
Missens	792114	A>G	Ser249Gly
Missens	792124	G>A	Gly252Asp
Codon deletion	792190-792192	GCG>-	Gly274-
Missens	792401	C>A	Asp344Glu

689

690

In review

691 **References**

- 692 Aspedon, A., Palmer, K., and Whiteley, M. (2006). Microarray analysis of the osmotic stress
693 response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 2721-2725. doi:
694 10.1128/JB.188.7.2721-2725.2006.
- 695 Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against
696 aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38, 1126-1145. doi: 10.1111/1574-6976.12077.
- 697 Baraquet, C., and Harwood, C.S. (2016). FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed
698 by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas*
699 *aeruginosa*. *J Bacteriol* 198, 178-186. doi: 10.1128/JB.00539-15.
- 700 Baraquet, C., and Harwood, C.S. (2017). Use of Nonradiochemical DNase Footprinting to
701 Analyze c-di-GMP Modulation of DNA-Binding Proteins. *Methods Mol Biol* 1657,
702 303-315. doi: 10.1007/978-1-4939-7240-1_24.
- 703 Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R., and Harwood, C.S. (2012). The FleQ protein from
704 *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene
705 expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*
706 40, 7207-7218. doi: 10.1093/nar/gks384.
- 707 Baynham, P.J., Brown, A.L., Hall, L.L., and Wozniak, D.J. (1999). *Pseudomonas aeruginosa*
708 AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and
709 *algD* transcriptional activation. *Mol Microbiol* 33, 1069-1080. doi: 10.1046/j.1365-
710 2958.1999.01550.x.
- 711 Baynham, P.J., and Wozniak, D.J. (1996). Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-
712 dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa algD*
713 transcription. *Mol Microbiol* 22, 97-108. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02659.x.
- 714 Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., et al.
715 (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration
716 of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529-2542. doi: 10.1099/mic.0.28185-0.
- 717 Bazire, A., Dheilly, A., Diab, F., Morin, D., Jebbar, M., Haras, D., et al. (2005). Osmotic stress
718 and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and
719 rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 253, 125-
720 131. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.029.
- 721 Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal
722 dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427(6969), 72-74. doi:
723 10.1038/nature02241.
- 724 Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., et al. (2014).
725 Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for
726 *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* 196, 345-356. doi:
727 10.1128/JB.01034-13.
- 728 Boechat, A.L., Kaihama, G.H., Politi, M.J., Lepine, F., and Baldini, R.L. (2013). A novel role
729 for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in
730 *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8, e84775. doi: 10.1371/journal.pone.0084775.
- 731 Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
732 sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- 733 Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R.
734 (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce
735 the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 75, 827-842. doi: 10.1111/j.1365-
736 2958.2009.06991.x.
- 737 Bos, J., Zhang, Q., Vyawahare, S., Rogers, E., Rosenberg, S.M., and Austin, R.H. (2015).
738 Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. *Proc Natl*
739 *Acad Sci U S A* 112, 178-183. doi: 10.1073/pnas.1420702111.

- 740 Bouffartigues, E., Duchesne, R., Bazire, A., Simon, M., Maillot, O., Dufour, A., et al. (2014).
741 Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the
742 extracytoplasmic function sigma factor SigX. *FEMS Microbiol Lett* 356, 193-200. doi:
743 10.1111/1574-6968.12482.
- 744 Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., et al. (2012).
745 Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the
746 SigX sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* 194, 4301-4311. doi:
747 10.1128/JB.00509-12.
- 748 Bouffartigues, E., Moscoso, J.A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompte, L., Gicquel, G., et
749 al. (2015). The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased
750 biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front Microbiol* 6, 630. doi:
751 10.3389/fmicb.2015.00630.
- 752 Breidenstein, E.B., Janot, L., Strehmel, J., Fernandez, L., Taylor, P.K., Kukavica-Ibrulj, I., et
753 al. (2012). The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.
754 *PLoS One* 7, e49123. doi: 10.1371/journal.pone.0049123.
- 755 Brinkman, F.S., Schoofs, G., Hancock, R.E., and De Mot, R. (1999). Influence of a putative
756 ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in
757 *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 181, 4746-4754.
- 758 Burgener, E.B., Sweere, J.M., Bach, M.S., Secor, P.R., Haddock, N., Jennings, L.K., et al.
759 (2019). Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung
760 infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 11(488). doi:
761 10.1126/scitranslmed.aau9748.
- 762 Bushnell, B., Rood, J., and Singer, E. (2017). BBMerge - Accurate paired shotgun read merging
763 via overlap. *PLoS One* 12, e0185056. doi: 10.1371/journal.pone.0185056.
- 764 Castang, S., and Dove, S.L. (2012). Basis for the essentiality of H-NS family members in
765 *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 194, 5101-5109. doi: 10.1128/JB.00932-12.
- 766 Chen, Y., Milam, S.L., and Erickson, H.P. (2012). SulaA inhibits assembly of FtsZ by a simple
767 sequestration mechanism. *Biochemistry* 51, 3100-3109. doi: 10.1021/bi201669d.
- 768 Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., et al.
769 (2018). Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim*
770 *Biophys Acta Gene Regul Mech.* 1862, 706-721. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.04.008.
- 771 Chew, S.C., Kundukad, B., Seviour, T., van der Maarel, J.R., Yang, L., Rice, S.A., et al. (2014).
772 Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides.
773 *MBio* 5(4), e01536-01514. doi: 10.1128/mBio.01536-14.
- 774 Chichili, G.R., and Rodgers, W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft
775 structure. *Cell Mol Life Sci* 66, 2319-2328. doi: 10.1007/s00018-009-0022-6.
- 776 Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., et al. (2012). The Pel
777 and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within
778 the biofilm matrix. *Environ Microbiol* 14, 1913-1928. doi: 10.1111/j.1462-
779 2920.2011.02657.x.
- 780 Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T.K. (2007). Temporal gene-expression in
781 *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 9, 332-346. doi: 10.1111/j.1462-
782 2920.2006.01143.x.
- 783 Duchesne, R., Bouffartigues, E., Oxaran, V., Maillot, O., Benard, M., Feuilloley, M.G., et al.
784 (2013). A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer
785 membrane composition. *J Proteomics* 94, 451-459. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.022.
- 786 Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis:
787 cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 504-528. doi:
788 10.1128/MMBR.00021-10.

- 789 Finnan, S., Morrissey, J.P., O'Gara, F., and Boyd, E.F. (2004). Genome diversity of
790 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital
791 environment. *J Clin Microbiol* 42, 5783-5792. doi: 10.1128/JCM.42.12.5783-
792 5792.2004.
- 793 Firoved, A.M., Boucher, J.C., and Deretic, V. (2002). Global genomic analysis of AlgU
794 ($\sigma(E)$)-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and
795 implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 184, 1057-1064.
796 doi: 10.1128/jb.184.4.1057-1064.2002.
- 797 Flechard, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., et al.
798 (2018). The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane
799 fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 8, 17212. doi: 10.1038/s41598-018-
800 35503-3.
- 801 Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., et al. (2013).
802 The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-
803 related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8, e80407. doi:
804 10.1371/journal.pone.0080407.
- 805 Goldberg, J.B. (2000). *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol* 8, 55-57. doi:
806 10.1016/s0966-842x(99)01671-6.
- 807 Govindarajan, S., and Amster-Choder, O. (2017). The bacterial Sec system is required for the
808 organization and function of the MreB cytoskeleton. *PLoS Genet* 13, e1007017. doi:
809 10.1371/journal.pgen.1007017.
- 810 Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A.,
811 et al. (2017). Proteomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Adhering to Solid
812 Surfaces. *Front Microbiol* 8, 1465. doi: 10.3389/fmicb.2017.01465.
- 813 Hancock, R.E., and Carey, A.M. (1979). Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-
814 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* 140, 902-910.
- 815 Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K., et al.
816 (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program
817 COMSTAT. *Microbiology* 146, 2395-2407. doi: 10.1099/00221287-146-10-2395.
- 818 Hickman, J.W., and Harwood, C.S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas*
819 *aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* 69, 376-389.
820 doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x.
- 821 Higashitani, N., Higashitani, A., Roth, A., and Horiuchi, K. (1992). SOS induction in
822 *Escherichia coli* by infection with mutant filamentous phage that are defective in
823 initiation of complementary-strand DNA synthesis. *J Bacteriol* 174, 1612-1618. doi:
824 10.1128/jb.174.5.1612-1618.1992.
- 825 Hoiby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic
826 fibrosis. *Future Microbiol* 5, 1663-1674. doi: 10.2217/fmb.10.125.
- 827 Holland, S.J., Sanz, C., and Perham, R.N. (2006). Identification and specificity of pilus
828 adsorption proteins of filamentous bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*.
829 *Virology* 345, 540-548. doi: 10.1016/j.virol.2005.10.020.
- 830 Hui, J.G., Mai-Prochnow, A., Kjelleberg, S., McDougald, D., and Rice, S.A. (2014).
831 Environmental cues and genes involved in establishment of the superinfective Pf4 phage
832 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 5, 654. doi: 10.3389/fmicb.2014.00654.
- 833 Irazoki, O., Mayola, A., Campoy, S., and Barbe, J. (2016). SOS System Induction Inhibits the
834 Assembly of Chemoreceptor Signaling Clusters in *Salmonella enterica*. *PLoS One* 11,
835 e0146685. doi: 10.1371/journal.pone.0146685.
- 836 Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., et al.
837 (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the

- 838 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11353-11358.
839 doi: 10.1073/pnas.1503058112.
- 840 Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., et al. (2014). ChIP-Seq and
841 RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and
842 biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 10, e1003984. doi:
843 10.1371/journal.ppat.1003984.
- 844 Jones, C.J., Ryder, C.R., Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2013). AmrZ modulates
845 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the
846 *psl* operon. *J Bacteriol* 195, 1637-1644. doi: 10.1128/JB.02190-12.
- 847 Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., and Hultgren, S.J. (2008). Morphological plasticity
848 as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* 6, 162-168. doi:
849 10.1038/nrmicro1820.
- 850 Kelley, W.L. (2006). Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA
851 regulon. *Mol Microbiol* 62, 1228-1238. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05444.x.
- 852 Kirov, S.M., Webb, J.S., O'May C, Y., Reid, D.W., Woo, J.K., Rice, S.A., et al. (2007). Biofilm
853 differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients
854 with cystic fibrosis. *Microbiology* 153, 3264-3274. doi: 10.1099/mic.0.2007/009092-0.
- 855 Knezevic, P., Voet, M., and Lavigne, R. (2015). Prevalence of Pfl-like (pro)phage genetic
856 elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Virology* 483, 64-71. doi:
857 10.1016/j.virol.2015.04.008.
- 858 Kondo, F., and Satoh, S. (1995). Effects of subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam
859 antibiotics against R-plasmid-bearing bacteria. *Chemotherapy* 41, 125-133. doi:
860 10.1159/000239333.
- 861 Kong, W., Zhao, J., Kang, H., Zhu, M., Zhou, T., Deng, X., et al. (2015). ChIP-seq reveals the
862 global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.
863 *Nucleic Acids Res* 43, 8268-8282. doi: 10.1093/nar/gkv747.
- 864 Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., and Johnson, R.P. (2009).
865 Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol*
866 501, 69-76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7.
- 867 Kruse, T., Moller-Jensen, J., Lobner-Olesen, A., and Gerdes, K. (2003). Dysfunctional MreB
868 inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* 22, 5283-5292. doi:
869 10.1093/emboj/cdg504.
- 870 Lammens, E., Ceyssens, P.J., Voet, M., Hertveldt, K., Lavigne, R., and Volckaert, G. (2009).
871 Representational Difference Analysis (RDA) of bacteriophage genomes. *J Microbiol*
872 *Methods* 77, 207-213. doi: 10.1016/j.mimet.2009.02.006.
- 873 Li, Y., Liu, X., Tang, K., Wang, P., Zeng, Z., Guo, Y., et al. (2019). Excisionase in Pf
874 filamentous prophage controls lysis-lysogeny decision-making in *Pseudomonas*
875 *aeruginosa*. *Mol Microbiol* 111, 495-513. doi: 10.1111/mmi.14170.
- 876 Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa*
877 infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2, 1051-1060.
- 878 Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M.R., and Wozniak, D.J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*
879 Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *J Bacteriol* 189, 8353-8356.
880 doi: 10.1128/JB.00620-07.
- 881 Mai-Prochnow, A., Hui, J.G., Kjelleberg, S., Rakonjac, J., McDougald, D., and Rice, S.A.
882 (2015). 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on
883 fitness of their host'. *FEMS Microbiol Rev* 39, 465-487. doi: 10.1093/femsref/fuu007.
- 884 Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., et al. (2008).
885 Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*
886 105, 3100-3105. doi: 10.1073/pnas.0711982105.

- 887 Matsuyama, B.Y., Krasteva, P.V., Baraquet, C., Harwood, C.S., Sondermann, H., and Navarro,
888 M.V. (2016). Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm
889 regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E209-
890 218. doi: 10.1073/pnas.1523148113.
- 891 Maunders, E., and Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm
892 formation. *FEMS Microbiol Lett* 364(13). doi: 10.1093/femsle/fnx120.
- 893 McElroy, K.E., Hui, J.G., Woo, J.K., Luk, A.W., Webb, J.S., Kjelleberg, S., et al. (2014).
894 Strain-specific parallel evolution drives short-term diversification during *Pseudomonas*
895 *aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1419-1427. doi:
896 10.1073/pnas.1314340111.
- 897 Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., and Gurevich, A. (2018). Versatile
898 genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34, i142-i150. doi:
899 10.1093/bioinformatics/bty266.
- 900 Mooij, M.J., Drenkard, E., Llamas, M.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Savelkoul, P.H.,
901 Ausubel, F.M., et al. (2007). Characterization of the integrated filamentous phage Pf5
902 and its involvement in small-colony formation. *Microbiology* 153, 1790-1798. doi:
903 10.1099/mic.0.2006/003533-0.
- 904 Pamp, S.J., Sternberg, C., and Tolker-Nielsen, T. (2009). Insight into the microbial multicellular
905 lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* 75, 90-103.
906 doi: 10.1002/cyto.a.20685.
- 907 Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015). Type IV pili
908 mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl*
909 *Acad Sci U S A* 112, 7563-7568. doi: 10.1073/pnas.1502025112.
- 910 Platt, M.D., Schurr, M.J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., et al. (2008).
911 Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic
912 *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic
913 fibrosis airway conditions. *J Bacteriol* 190, 2739-2758. doi: 10.1128/JB.01683-07.
- 914 Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., and Russel, M. (2011). Filamentous
915 bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues*
916 *Mol Biol* 13, 51-76.
- 917 Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., et al. (2009). The biofilm
918 life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous
919 prophage. *ISME J* 3, 271-282. doi: 10.1038/ismej.2008.109.
- 920 Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., and Bazire, A. (2015). Antibiofilm Activity of the
921 Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative
922 Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob Proteins* 7, 45-51. doi:
923 10.1007/s12602-014-9173-3.
- 924 Romling, U., and Galperin, M.Y. (2017). Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP.
925 *Methods Mol Biol* 1657, 1-8. doi: 10.1007/978-1-4939-7240-1_1.
- 926 Roux, S., Krupovic, M., Daly, R.A., Borges, A.L., Nayfach, S., Schulz, F., et al. (2019). Cryptic
927 inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nat*
928 *Microbiol* 4, 1895-1906. doi: 10.1038/s41564-019-0510-x.
- 929 Rybtke, M.T., Borlee, B.R., Murakami, K., Irie, Y., Hentzer, M., Nielsen, T.E., et al. (2012).
930 Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas*
931 *aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 78, 5060-5069. doi: 10.1128/AEM.00414-12.
- 932 Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D.J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas*
933 *aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10, 644-648. doi:
934 10.1016/j.mib.2007.09.010.
- 935 Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dotsch, A., et al. (2015).
936 Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a

- 937 modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog* 11,
 938 e1004744. doi: 10.1371/journal.ppat.1004744.
- 939 Secor, P.R., Jennings, L.K., Michaels, L.A., Sweere, J.M., Singh, P.K., Parks, W.C., et al.
 940 (2015a). Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize
 941 the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb Cell* 3, 49-52.
 942 doi: 10.15698/mic2016.01.475.
- 943 Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., et al.
 944 (2017). Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the
 945 Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo. *Infect Immun* 85.
 946 doi: 10.1128/IAI.00648-16.
- 947 Secor, P.R., Sweere, J.M., Michaels, L.A., Malkovskiy, A.V., Lazzareschi, D., Katznelson, E.,
 948 et al. (2015b). Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function.
 949 *Cell Host Microbe* 18, 549-559. doi: 10.1016/j.chom.2015.10.013.
- 950 Spiers, A.J., Buckling, A., and Rainey, P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity.
 951 *Microbiology* 146, 2345-2350. doi: 10.1099/00221287-146-10-2345.
- 952 Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D., and Lazazzera, B.A. (2003). Identification of
 953 catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus*
 954 *subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* 185, 1951-1957. doi:
 955 10.1128/jb.185.6.1951-1957.2003.
- 956 Strahl, H., Burmann, F., and Hamoen, L.W. (2014). The actin homologue MreB organizes the
 957 bacterial cell membrane. *Nat Commun* 5, 3442. doi: 10.1038/ncomms4442.
- 958 Strehmel, J., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Brenner-Weiss, G., and Overhage, J. (2015).
 959 Sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in
 960 *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Appl Environ Microbiol* 81, 1274-1285. doi:
 961 10.1128/AEM.02832-14.
- 962 Tan, J., Rouse, S.L., Li, D., Pye, V.E., Vogeley, L., Brinth, A.R., et al. (2014). A conformational
 963 landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas*
 964 *aeruginosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 2054-2068. doi:
 965 10.1107/S1399004714001850.
- 966 Tolker-Nielsen, T., and Sternberg, C. (2011). Growing and analyzing biofilms in flow
 967 chambers. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 1, Unit 1B 2. doi:
 968 10.1002/9780471729259.mc01b02s21.
- 969 Vorregaard, M. (2008). Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms. PhD
 970 thesis, Technical University of Denmark, Lyngby.
- 971 Wachi, M., and Matsushashi, M. (1989). Negative control of cell division by *mreB*, a gene that
 972 functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 171, 3123-
 973 3127. doi: 10.1128/jb.171.6.3123-3127.1989.
- 974 Wang, C., Nie, T., Lin, F., Connerton, I.F., Lu, Z., Zhou, S., et al. (2019). Resistance
 975 mechanisms adopted by a *Salmonella Typhimurium* mutant against bacteriophage. *Virus*
 976 *Res* 273, 197759. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197759.
- 977 Wang, X., and Wood, T.K. (2016). Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug*
 978 *Resist Updat* 27, 30-38. doi: 10.1016/j.drug.2016.06.001.
- 979 Webb, J.S., Lau, M., and Kjelleberg, S. (2004). Bacteriophage and phenotypic variation in
 980 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186, 8066-8073. doi:
 981 10.1128/JB.186.23.8066-8073.2004.
- 982 Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., et al. (2003).
 983 Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185, 4585-
 984 4592. doi: 10.1128/jb.185.15.4585-4592.2003.
- 985 Wei, Q., and Ma, L.Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.
 986 *Int J Mol Sci* 14, 20983-21005. doi: 10.3390/ijms141020983.

- 987 Wei, Q., Minh, P.N., Dotsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., et al. (2012).
988 Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic
989 pathogen. *Nucleic Acids Res* 40, 4320-4333. doi: 10.1093/nar/gks017.
- 990 Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., et al.
991 (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413(6858), 860-
992 864. doi: 10.1038/35101627.
- 993 Whitney, J.C., Whitfield, G.B., Marmont, L.S., Yip, P., Neculai, A.M., Lobsanov, Y.D., et al.
994 (2015). Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate
995 production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 290, 12451-12462. doi:
996 10.1074/jbc.M115.645051.
- 997 Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., and Holt, K.E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial
998 genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13,
999 e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- 1000 Wingett, S.W., and Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and
1001 quality control. *F1000Res* 7, 1338. doi: 10.12688/f1000research.15931.2.
- 1002 Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S. (2016).
1003 Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes
1004 in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 44(D1), D646-653. doi:
1005 10.1093/nar/gkv1227.
- 1006 Wood, L.F., Leech, A.J., and Ohman, D.E. (2006). Cell wall-inhibitory antibiotics activate the
1007 alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of sigma (AlgT) and
1008 the AlgW and Prc proteases. *Mol Microbiol* 62, 412-426. doi: 10.1111/j.1365-
1009 2958.2006.05390.x.
- 1010 Wood, L.F., and Ohman, D.E. (2009). Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U)
1011 activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol*
1012 *Microbiol* 72, 183-201. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06635.x.
- 1013 Xu, B., Ju, Y., Soukup, R.J., Ramsey, D.M., Fishel, R., Wysocki, V.H., et al. (2016a). The
1014 *Pseudomonas aeruginosa* AmrZ C-terminal domain mediates tetramerization and is
1015 required for its activator and repressor functions. *Environ Microbiol Rep* 8, 85-90. doi:
1016 10.1111/1758-2229.12354.
- 1017 Xu, B., Soukup, R.J., Jones, C.J., Fishel, R., and Wozniak, D.J. (2016b). *Pseudomonas*
1018 *aeruginosa* AmrZ Binds to Four Sites in the *algD* Promoter, Inducing DNA-AmrZ
1019 Complex Formation and Transcriptional Activation. *J Bacteriol* 198, 2673-2681. doi:
1020 10.1128/JB.00259-16.
- 1021 Yang, L., Hengzhuang, W., Wu, H., Damkiaer, S., Jochumsen, N., Song, Z., et al. (2012).
1022 Polysaccharides serve as scaffold of biofilms formed by mucoid *Pseudomonas*
1023 *aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 366-376. doi: 10.1111/j.1574-
1024 695X.2012.00936.x.
- 1025 Zaborskyte, G., Andersen, J.B., Kragh, K.N., and Ciofu, O. (2017). Real-Time Monitoring of
1026 *nfxB* Mutant Occurrence and Dynamics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Exposed
1027 to Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 61(3).
1028 doi: 10.1128/AAC.02292-16.

Figure 1.TIF

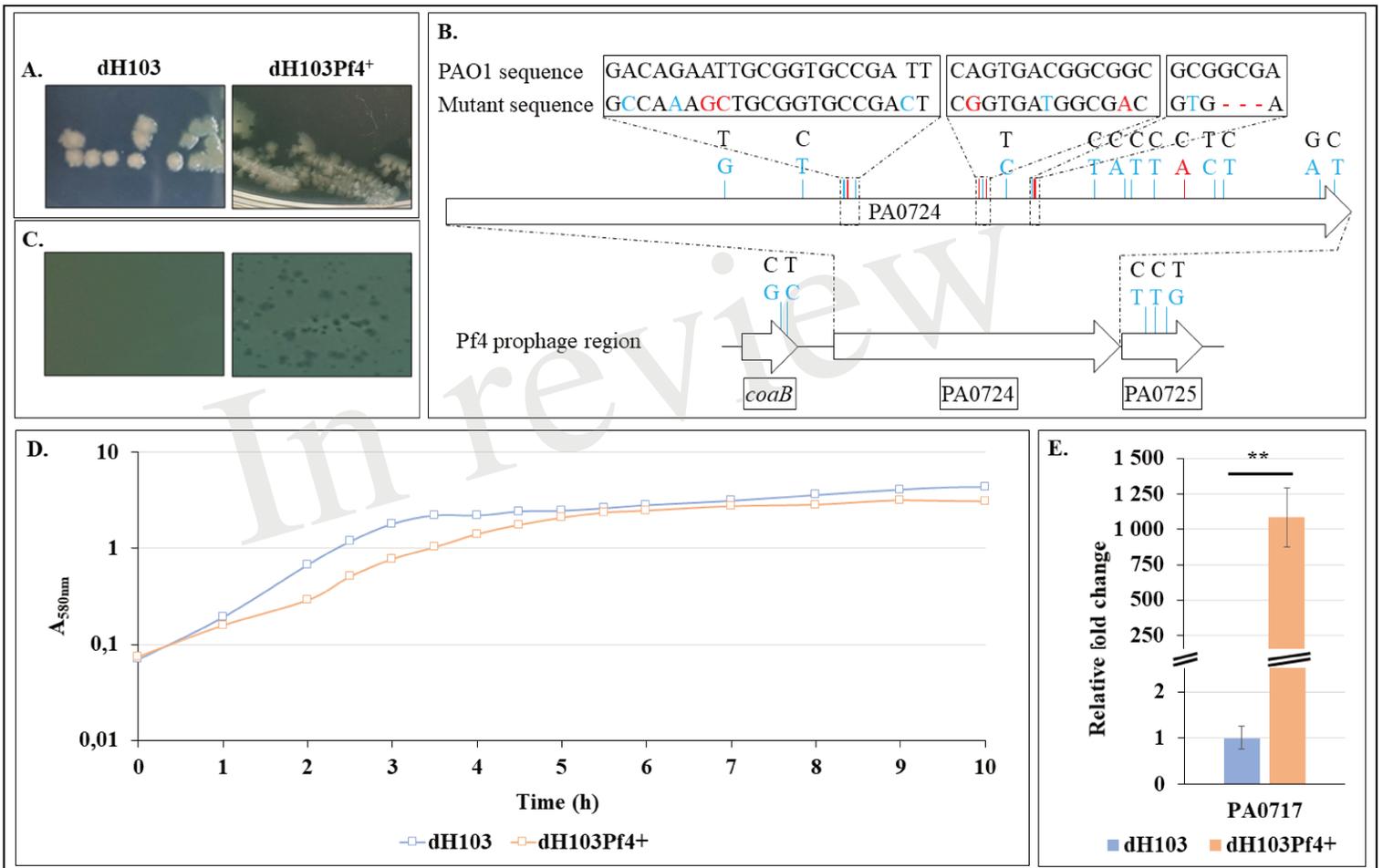


Figure 2.TIF

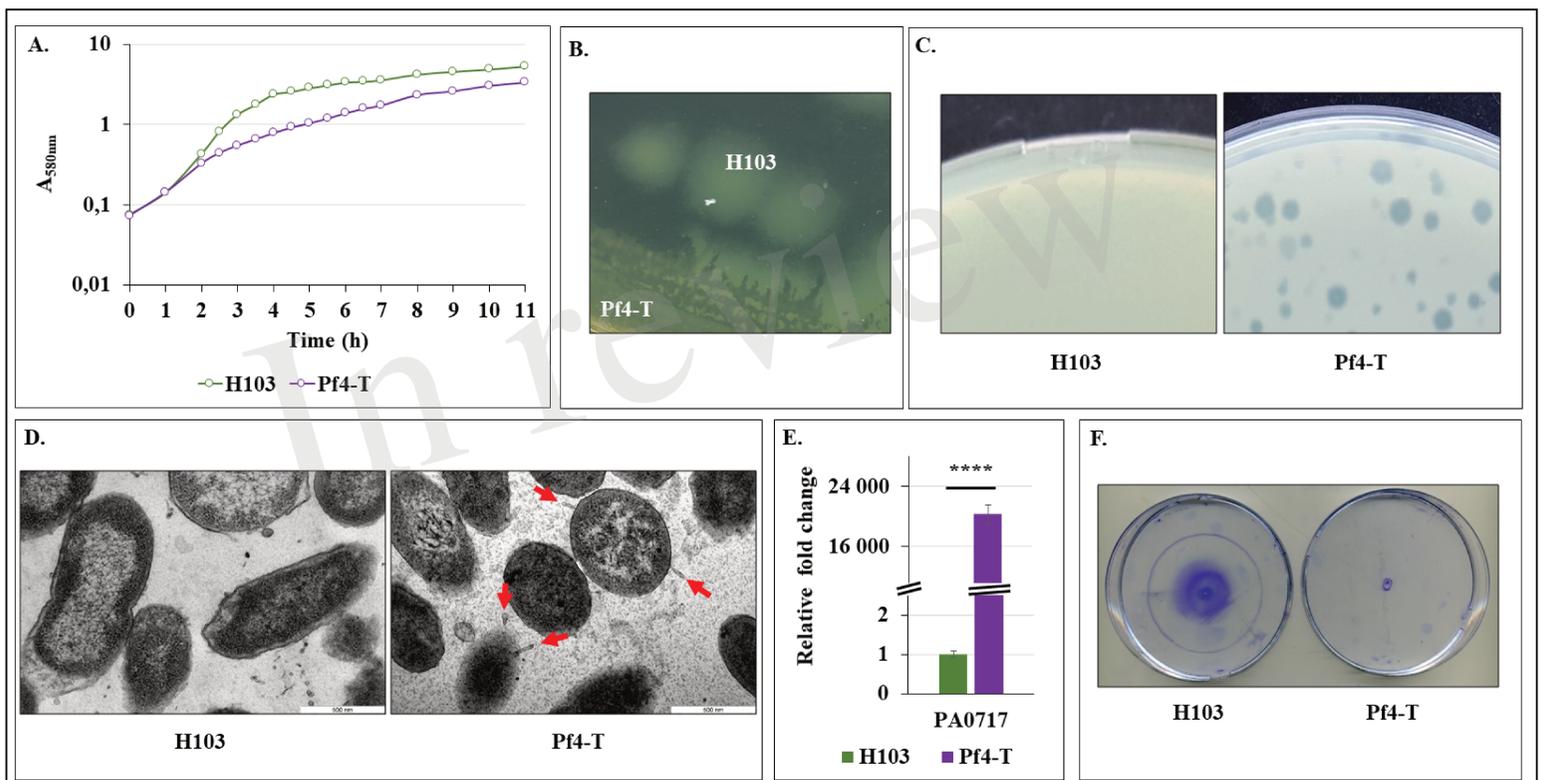


Figure 3.TIF

In review

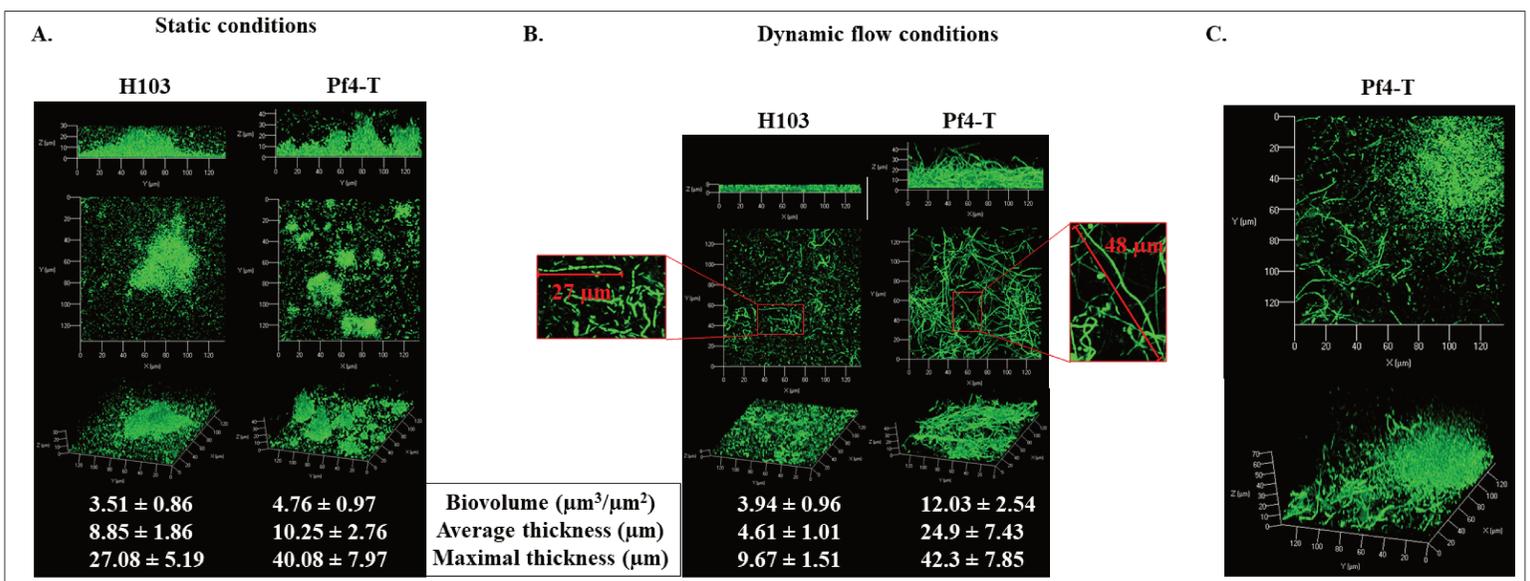


Figure 4.TIF

In review

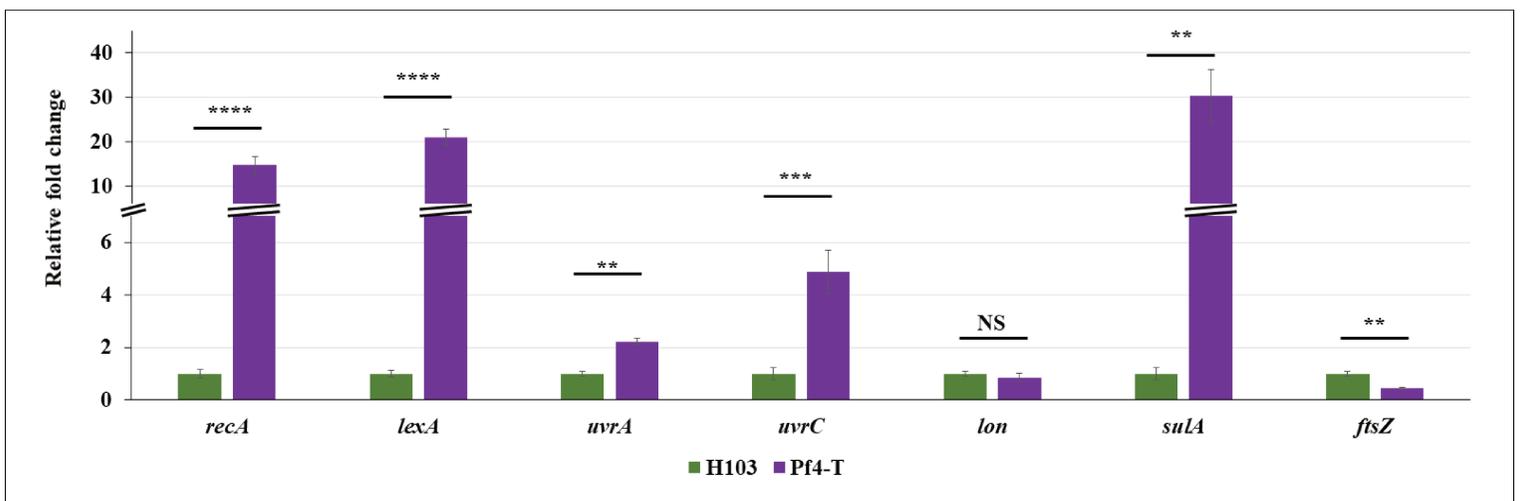


Figure 5.TIF

In review

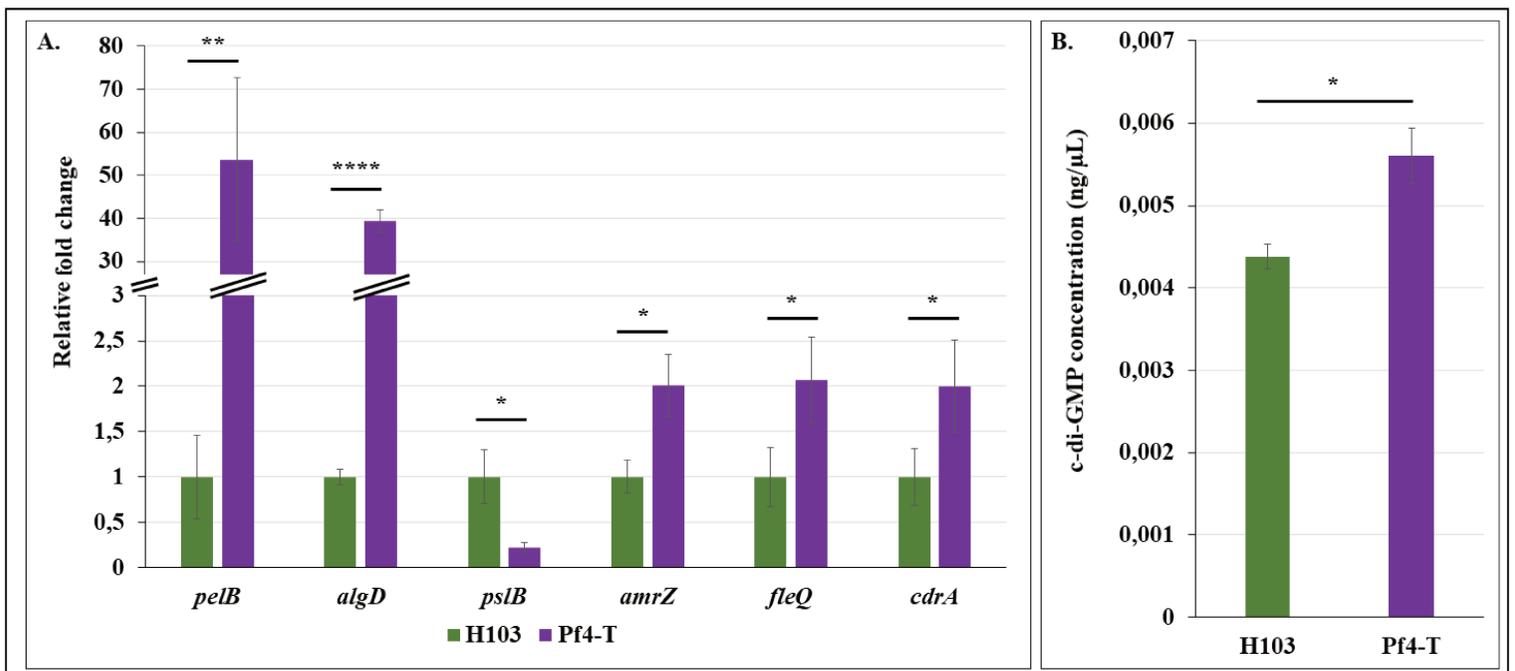


Figure 6.TIF

In review

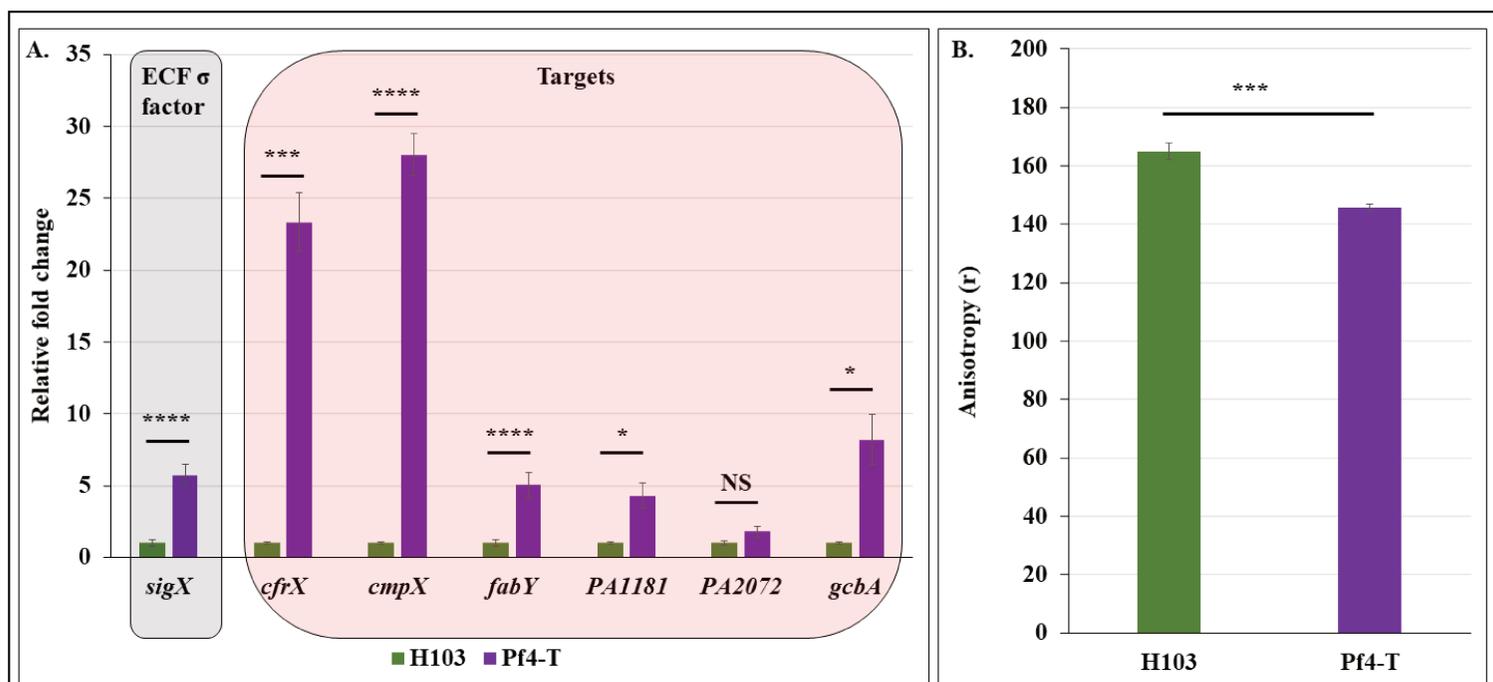


Figure 7.TIF

In review

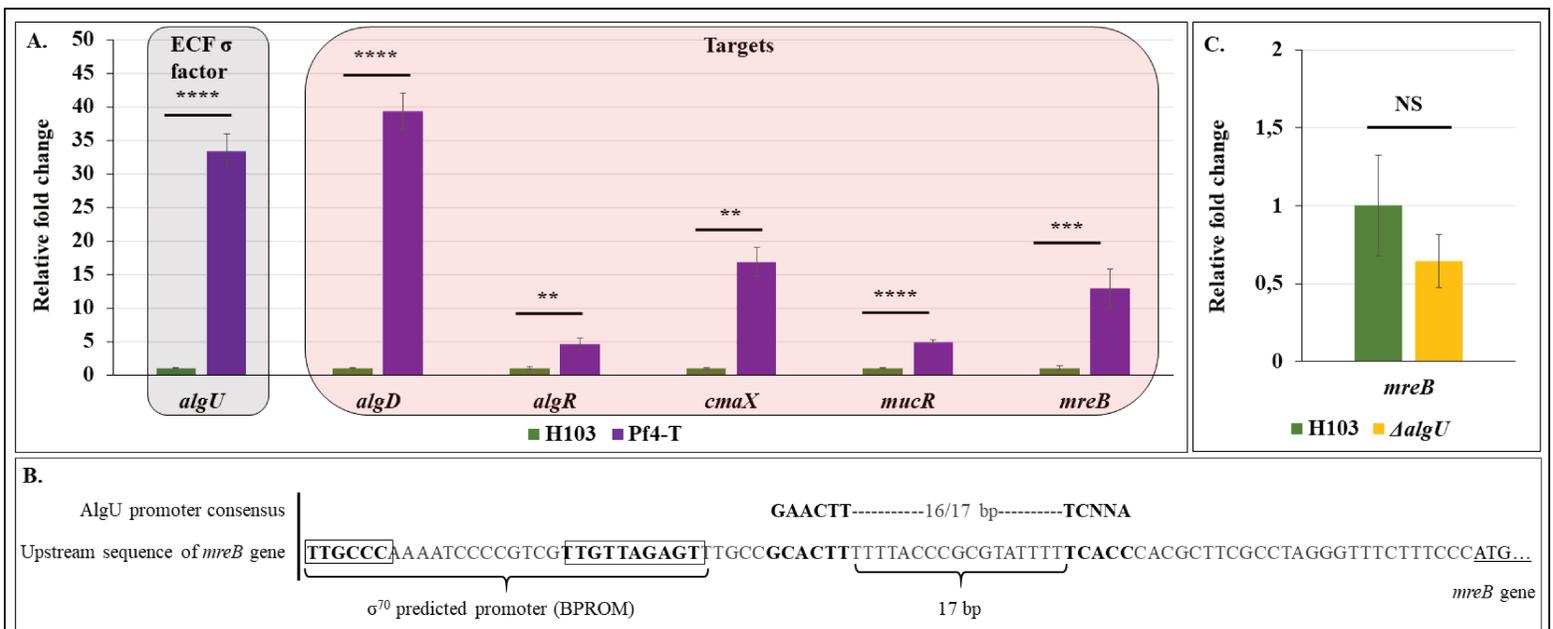
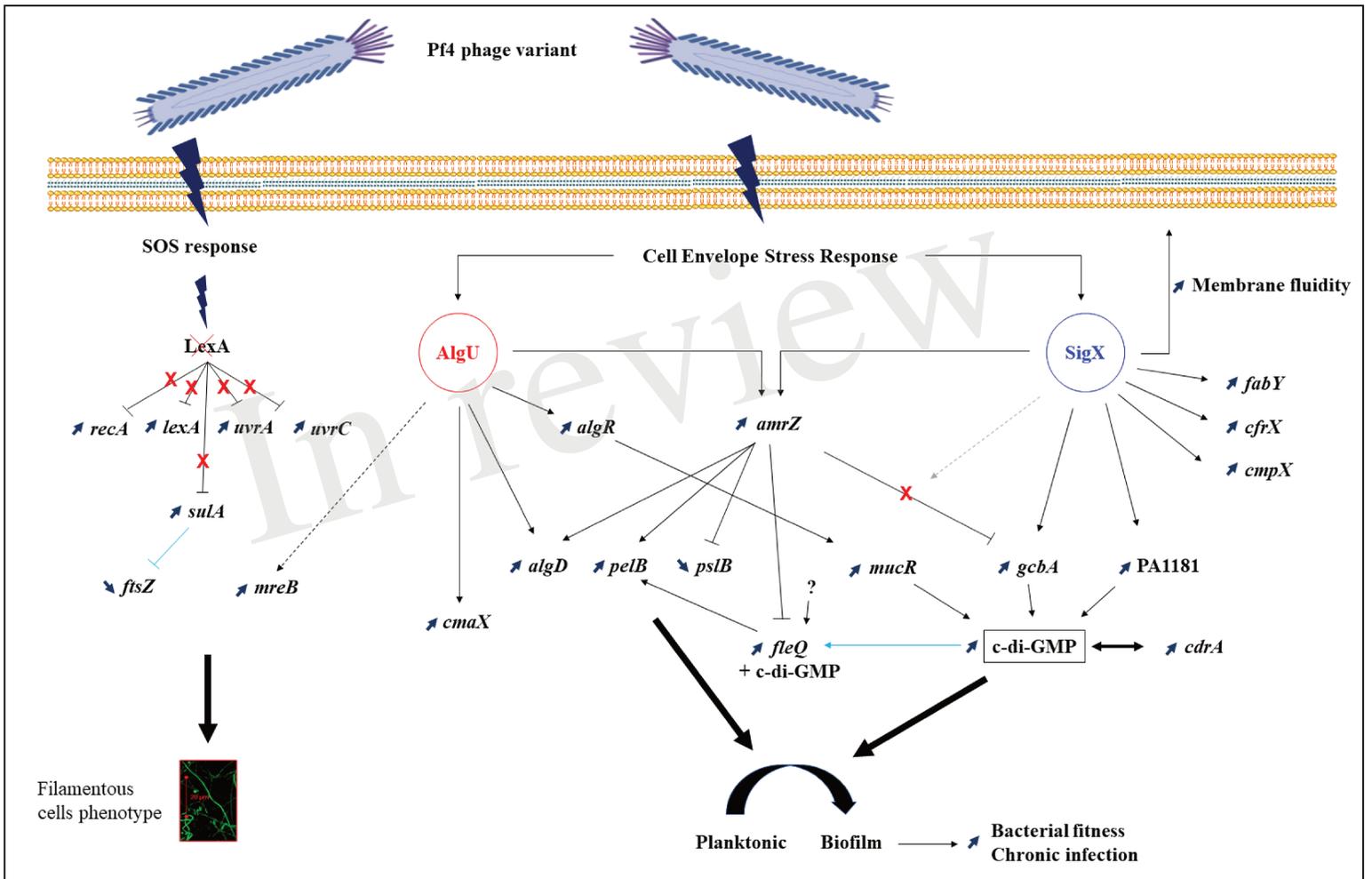


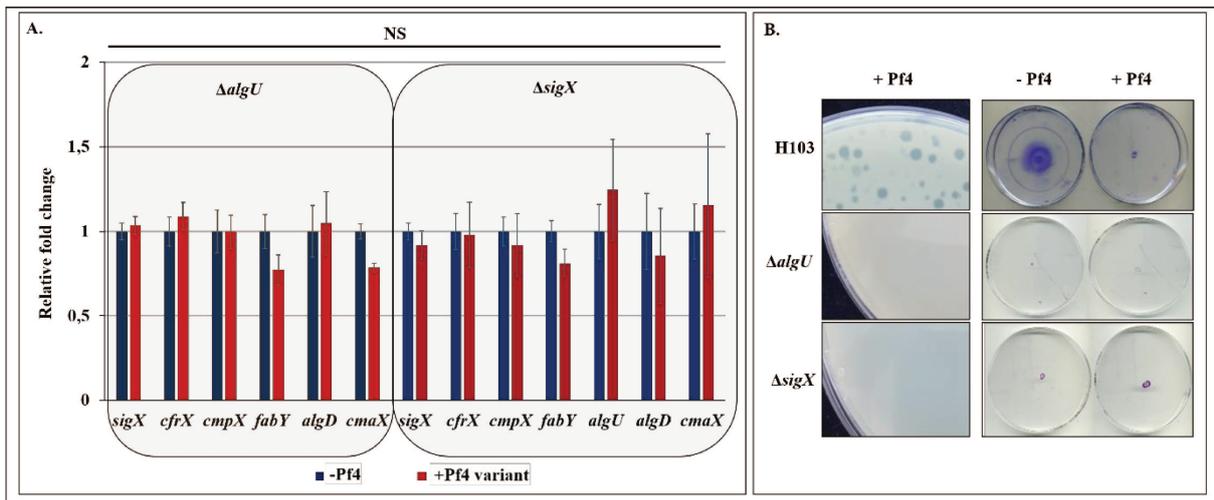
Figure 8.TIF



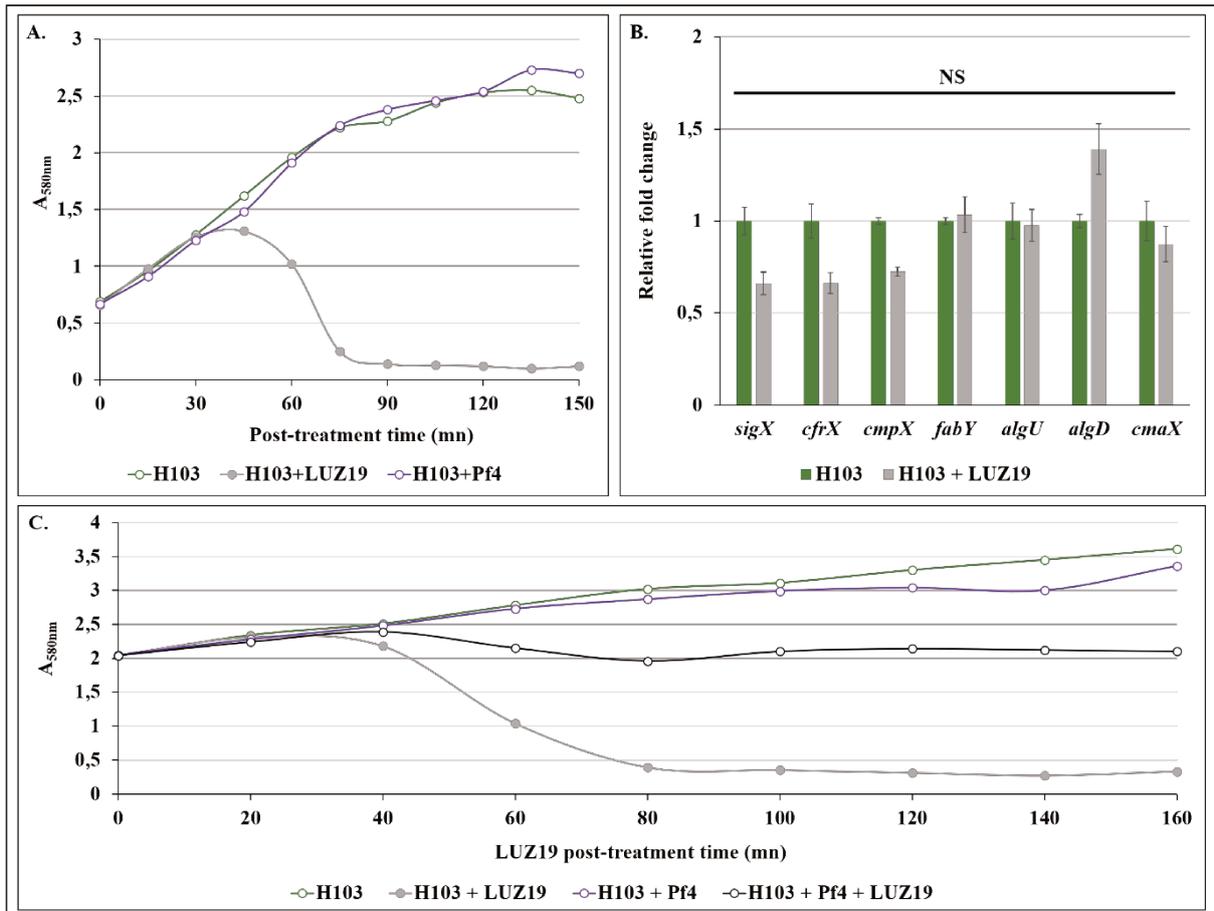
Supplementary Figures.

P14 prophage reference	ATGAAAGCAATGAAGCAACGCATCGCCAAGTTACGCCGGTCCCTCGTTCGCCAACCTGTGCATCGCCGGTCCGTCCTGCGCGGACTTCGCTGCCGGCCCTTCGCCGG
P14 prophage variant	ATGAAAGCAATGAAGCAACGCATCGCCAAGTTACGCCGGTCCCTCGTTCGCCAACCTGTGCATCGCCGGTCCGTCCTGCGCGGACTTCGCTGCCGGCCCTTCGCCGG
	GGTGTACGACACACAGCGCGGTGGAATCGGGCATCACCGATGGCCAGGGGATATGAAGGCCATTGGCGGCTACATCGTCGGCGCCCTGGTGTACCTGGCCGTGGCCGGCC
	GGTGTACGACACACAGCGCGGTGGAATCGGGCATCACCGATGGCCAGGGGATATGAAGGCCATTGGCGGCTACATCGTCGGCGCCCTGGTGTACCTGGCCGTGGCCGGCC
	TGATCTACAGCATGTTGCGCAAGGCGTAACGGGTGCTCTGGTCGGTGTGGTTGGGGGCGTTCCTCGCCGGCGCCCTTCATCACCGGGTACCGGACCGGGCAATTTCTTCTAA
	TGATCTACAGCATGTTGCGCAAGGCGTAACGGGTGCTCTGGTCGGTGTGGTTGGGGGCGTTCCTCGCCGGCGCCCTTCATCACCGGGTACCGGACCGGGCAATTTCTTCTAA
	CCGAACAGACCGAGGGCGGAAGCCCTCCGGAGTTTCGGGCAAGGGGCTTTTTTGTGTGGGCTTACGATGAAAGTTTGCAGGCTGATTCTGTATGCTTCTCTTTGCCAC
	CCGAACAGACCGAGGGCGGAAGCCCTCCGGAGTTTCGGGCAAGGGGCTTTTTTGTGTGGGCTTACGATGAAAGTTTGCAGGCTGATTCTGTATGCTTCTCTTTGCCAC
	GGTGGCGAGGGCTGAGGATTACTACTGGAATAATCAGTCACTGCCTGAACGCTTTCTTCGCCCTCGGACGTTGCGCGGCTGGGCCAAAGCCACGGGACCCCTGGGG
	GGTGGCGAGGGCTGAGGATTACTACTGGAATAATCAGTCACTGCCTGAACGCTTTCTTCGCCCTCGGACGTTGCGCGGCTGGGCCAAAGCCACGGGACCCCTGGGG
	AGTTACCTTCACCGGGTCTATGAAAGCCCGTGACCAGACCTCGTTTTGGTGGGAGTTACGAAACAACGAAACCGGCAAGACTGCTGCCGGGTATGGTCTGCCGGACCG
	AGTTACCTTCACCGGGTCTATGAAAGCCCGTGACCAGACCTCGTTTTGGTGGGAGTTACGAAACAACGAAACCGGCAAGACTGCTGCCGGGTATGGTCTGCCGGACCG
	TATGGCGATAGCTGTCCCGAGGGGACGGAATACGATAAGGCGACCGGGGTTTGTAAAGTGCCTCCGCAAGAATGCAAGGAAGGGCAACTGTTCCCGGCCAAAGGCCCGGA
	TATGGCGATAGCTGTCCCGAGGGGACGGAATACGATAAGGCGACCGGGGTTTGTAAAGTGCCTCCGCAAGAATGCAAGGAAGGGCAACTGTTCCCGGCCAAAGGCCCGGA
	CTCCCGTGGTACCTCGGGAGGGCGTAACATATGTGGTGACGGCGGCGCCCGACCGCTGCTATCAAAGCTGTGAGTATGGCGGCAATCCAGCCCGGCCAGTTGCT
	CTCCCGTGGTACCTCGGGAGGGCGTAACATATGTGGTGACGGCGGCGCCCGACCGCTGCTATCAAAGCTGTGAGTATGGCGGCAATCCAGCCCGGCCAGTTGCT
	ATTTGGTCAAAGGCTCCACCACGACCGGCTTCTGCAATACATCTCAAGGGCACCGGCAAGCTGGGGTGGCGATTCCTACACCTTCTCCAGACCGGGCAATTCGCTG
	ATTTGGTCAAAGGCTCCACCACGACCGGCTTCTGCAATACATCTCAAGGGCACCGGCAAGCTGGGGTGGCGATTCCTACACCTTCTCCAGACCGGGCAATTCGCTG
	AACCCCGCCGACACTCCGAACACCGATCTCCGACCCGAACGACCCCGGCTGCCCGCCGGCTGGTGTGGTGGGAACACTACCTGCGTCAAGGCCCGGACCGATCCAC
	AACCCCGCCGACACTCCGAACACCGATCTCCGACCCGAACGACCCCGGCTGCCCGCCGGCTGGTGTGGTGGGAACACTACCTGCGTCAAGGCCCGGACCGATCCAC
	GGATCCAACCGACCCGACCCGCGGGCTGTAGGGCCCGGGATGGCAATGGCGGTGGAAACAATAACCGCGCGGCAATGACCGCGGCAACCGGCAATGGCGGGACG
	GGATCCAACCGACCCGACCCGCGGGCTGTAGGGCCCGGGATGGCAATGGCGGTGGAAACAATAACCGCGCGGCAATGACCGCGGCAACCGGCAATGGCGGGACG
	GCACGGGGGAGGGGACGGCAACGGCGGGGGCGATGGTAGCGGCGACGGTAGCGGACGGGACGGGCGGGCGATGGCAAGGGCACCTGCGACCCCGGCAAGAGAAGTGC
	GCACGGGGGAGGGGACGGCAACGGCGGGGGCGATGGTAGCGGCGACGGTAGCGGACGGGACGGGCGGGCGATGGCAAGGGCACCTGCGACCCCGGCAAGAGAAGTGC
	TCCACCGGCCGGAAGGCCGGGGCGGAATCAAGGAGCCACGCCCGGCACTGGGATGACGCCATCGCCACTGGGAAAGAAGGTCGAGGAAGCCAAAGCAAGAAGT
	TCCACCGGCCGGAAGGCCGGGGCGGAATCAAGGAGCCACGCCCGGCACTGGGATGACGCCATCGCCACTGGGAAAGAAGGTCGAGGAAGCCAAAGCAAGAAGT
	CAAGACCAAGGTGAAGGCCAACGTCGATCAGATGAAGGGGCGCTTCGACCTCAACCTGGCGGAAGGGCGGGGCAACTGCCCTGCGAGTCCATGACCAATTTGGGGCAAGT
	CAAGACCAAGGTGAAGGCCAACGTCGATCAGATGAAGGGGCGCTTCGACCTCAACCTGGCGGAAGGGCGGGGCAACTGCCCTGCGAGTCCATGACCAATTTGGGGCAAGT
	CCTACTCCCTGTATCTCCGACTACGCCGGCCAACTCTCCAGCCTGCGCGTGGCGCTGCTGCTATGGCCCGCTGATCGCGCCCTCATTCTGCTGAAGGACTGACCC
	CCTACTCCCTGTATCTCCGACTACGCCGGCCAACTCTCCAGCCTGCGCGTGGCGCTGCTGCTATGGCCCGCTGATCGCGCCCTCATTCTGCTGAAGGACTGACCC
	TATGGAATGGCTCTCCGGTTTTCTCGATCAGATCATCGCCTTCTTCCAGTGGATCTGGGATTTCTTCGCCCAAGGCATCTATGACTTCGTGCGCGACGGCCCTGGTGGTCTG
	TATGGAATGGCTCTCCGGTTTTCTCGATCAGATCATCGCCTTCTTCCAGTGGATCTGGGATTTCTTCGCCCAAGGCATCTATGACTTCGTGCGCGACGGCCCTGGTGGTCTG
	CCACCAAGGGCTCGATGATACGCCCGCTCCAGACCCCTGATCCTGCTGATCGATGTCAAGTACACCGCCCGCCGGAAGTATCGACAGCTTGGCGTGGCCGAGATGATC
	CCACCAAGGGCTCGATGATACGCCCGCTCCAGACCCCTGATCCTGCTGATCGATGTCAAGTACACCGCCCGCCGGAAGTATCGACAGCTTGGCGTGGCCGAGATGATC
	CGCAGCATGTATGCCCGCTGCCGGCCCGATGGCGGGGGCTGGCCTTCTTCGGCGTGGCGAGGGCGTGAACATCATATGTCGCGGGCGGCGACGGCTTCTGCAT
	CGCAGCATGTATGCCCGCTGCCGGCCCGATGGCGGGGGCTGGCCTTCTTCGGCGTGGCGAGGGCGTGAACATCATATGTCGCGGGCGGCGACGGCTTCTGCAT
	GGCCTCGTGGCGTTTCAATGGGAGGTGA
	GGCCTCGTGGCGTTTCAATGGGAGGTGA

Supplementary Figure S1.



Supplementary Figure S2.



Supplementary Figure S3.

3. L'infection par les phages Pf4 conduit à la diminution de la virulence de *P. aeruginosa*

a. Article

La souche dH103Pf4⁺ présentait une activation de la voie Chp/Vfr, ainsi qu'une diminution de la virulence globale liée à la diminution des facteurs de virulence et la dérégulation du QS. Nous avons démontré lors de l'étude présentée précédemment une différence de réponse entre la souche dH103Pf4⁺ et l'infection de *P. aeruginosa* H103 par les phages Pf4 produits par cette dernière. Nous avons ainsi voulu évaluer si la virulence était également altérée dans les conditions de traitement par les phages Pf4.

Nous avons ainsi mis en évidence une diminution de la virulence globale, liée à une diminution de la cytotoxicité, de la production des facteurs de virulence et une production moins importante des HSL et HAQ dans la condition traitée. Cette diminution pourrait provenir de l'activité de QscR d'une part, et de l'activité d'AlgR d'autre part. Des études complémentaires sont nécessaires afin de terminer cet article. Notamment, le dosage des exotoxines T et S dans le surnageant, le dosage des rhamnolipides et le dosage de l'AMPc.

Dans cette étude, j'ai réalisé une partie des RT-qPCR, le dosage des facteurs de virulence, le test de cytotoxicité sur cellules A549 et le test de virulence chez *C. elegans*. J'ai également participé à la rédaction de l'article.

Pf4 phage infection reduced virulence-associated phenotypes in
Pseudomonas aeruginosa

Tortuel Damien¹, Tahrioui Ali¹, Cambronel Mélyssa¹, Lesouhaitier Olivier¹, Maillot Olivier¹,
David Audrey¹, Azuama Cecil¹, Feuilleley Marc GJ¹, Orange Nicole¹, Cornelis Pierre¹,
Chevalier Sylvie¹, Bouffartigues Emeline^{1*}

¹Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Laboratoire de Microbiologie
Signaux et Microenvironnement, LMSM EA4312, Évreux, France.

* Corresponding Author: Dr. Emeline Bouffartigues, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux,
France. Tel: +33-235140000; Fax: +33-232291550; emeline.bouffartigues@univ-rouen.fr

Running title: Pf4 infection affected *P. aeruginosa* virulence

Keywords: *P. aeruginosa*, Pf4 phage, virulence factors, quorum sensing, Vfr

1 ABSTRACT

2 Pf4 is a filamentous bacteriophage, which is integrated into the genome of *Pseudomonas*
3 *aeruginosa* PAO1 as a prophage. Infection of PAO1 with a superinfective Pf4 variant generates
4 a cell wall stress response involving both AlgU and SigX extracytoplasmic function sigma
5 factors. In the current study, we demonstrated that Pf4 variant infection also causes an important
6 *in vivo* reduction of *P. aeruginosa* virulence using *Caenorhabditis elegans* as a host infection
7 model as well as a reduced cytotoxicity on epithelial cells. Therefore, the results showed
8 decreased production of two important quorum sensing (QS) regulated virulence factors, the
9 phenazine pyocyanin and elastase. qRT-PCR analysis confirmed the reduced expression of
10 several QS-dependent virulence genes. Reduced expression of the *rhlR* gene of the *N*-acyl-
11 homoserine lactones (AHLs) QS branch is accompanied by a large increase of the orphan LuxR
12 QS antagonist regulator gene *qscR*, indicative of a perturbation of the AHL-dependent QS.
13 Similarly, the *pqsR*, *pqsA* and sRNA *phrS* genes of the PQS QS branch were less expressed, in
14 line with decreased production of 2-alkyl-4-quinolones (HAQs). In addition, decreased
15 expression of the general virulence regulator *vfr* gene was observed, although the Chp/Vfr
16 pathway seems to be activated. Altogether, alterations of QS, as well as of expression of master
17 QS regulators, suggest that Pf4-variant infection might result in complex networks
18 dysregulations, leading to reducing acute virulence in *P. aeruginosa*.

19 INTRODUCTION

20 *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen that causes acute
21 and chronic infections in immunocompromised hosts, among which patients with cystic
22 fibrosis, burns, or cancers (Lyczak et al., 2002; Branski et al., 2009; Fishman, 2011). Production
23 of virulence factors is a survival strategy for pathogens to evade the host immune defences
24 resulting in acute infections (Lau et al., 2005; Sadikot et al., 2005; Branski et al., 2009). In *P.*
25 *aeruginosa*, major virulence factors include lectin PA-1L, exotoxin A (ETA), elastase LasB
26 and pyocyanin. Lectin PA-1L is a galactose binding lectin, involved in lung injury, and exotoxin
27 A is a lethal toxin that inhibits protein synthesis in mammalian cells. LasB is an extracellular
28 elastolytic metalloproteinase involved in the degradation of the host cell membranes
29 (Yanagihara et al., 2003), and the phenazine pyocyanin contributes to tissue damage and
30 neutrophil defence inactivation (Lau et al., 2004a; Lau et al., 2004b; Allen et al., 2005; Caldwell
31 et al., 2009). In addition, the type III secretion system (T3SS) is responsible for the translocation
32 of toxins as ExoS or ExoT into eukaryotic cells (Shen et al., 2008), and is of major importance
33 in acute infections by facilitating dissemination of *P. aeruginosa* through epithelia, and by its
34 cytotoxic effect toward polymorphonuclear cells and macrophages (Engel and Balachandran,
35 2009).

36 The regulation of these virulence factors is complex and multifactorial, allowing *P.*
37 *aeruginosa* adaptation to a wide range of infection sites and environmental conditions. The
38 synchronized production of many secreted virulence factors is controlled by a cell density-
39 dependent quorum-sensing (QS) network, composed of transcriptional regulators (LasR, RhlR,
40 PqsR) and their cognate signalling molecules, the *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), 3-oxo-
41 C₁₂-HSL and C₄-HSL, and the 2-alkyl-4-quinolones (HAQs) including the 2-heptyl-3-hydroxy-
42 4-quinolone (PQS) and the 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) (Williams and Camara, 2009). The
43 circuit of QS systems is organized in a hierarchy manner with the *Las* branch at the top of the
44 cascade where LasR, in complex with 3-oxo-C₁₂-HSL, activates downstream genes that
45 includes the *lasI* synthase gene. The LasR–autoinducer complex also activates the expression
46 of *rhlR* and *rhlI*, which constitute the *Rhl* QS branch, and the *pqsR* and *pqsABCDH* genes,
47 which encode the *Pqs* system. RhlR operates similarly as LasR, when bound to C₄-HSL. The
48 PqsR–HHQ/PQS complex feeds back to activate the Rhl branch, which connects the three
49 signalling modules (Williams and Camara, 2009). In addition to QS, the production of virulence
50 factors is also controlled by some regulatory proteins, including the global virulence factor
51 regulator Vfr. Together with cyclic AMP (cAMP), Vfr activates the transcription of more than
52 200 genes (Beatson et al., 2002; Wolfgang et al., 2003; Kanack et al., 2006; Fuchs et al., 2010).

53 Filamentous bacteriophages are associated to chronic lung infections and antibiotic
54 resistance in cystic fibrosis (Burgener et al., 2019; Kelsey, 2019). *P. aeruginosa* PAO1 has an
55 integrated Pf4 prophage in its genome, encoding a relatively well-characterized filamentous
56 bacteriophage, which contributes to the bacterial biofilm organization and maturation (Webb et
57 al., 2004; Rice et al., 2009; Petrova et al., 2011). Pf4 infection relies on interaction with type 4
58 pili (TFP) receptors (Castang and Dove, 2012; McElroy et al., 2014; Secor et al., 2015). Pf4
59 variants are considered as superinfectives when they can re-infect and kill the prophage-
60 carrying host. In a previous study, we have shown that *P. aeruginosa* exposure to such Pf4
61 variants resulted in altered biofilm formation in static and dynamic conditions, in which
62 numerous bacteria displayed a filamentous morphology. In addition, Pf4 infection resulted in
63 increased SOS and cell wall stress (CWS) responses (Tortuel et al., 2020). CWS is mediated by
64 the two extracytoplasmic function (ECF) sigma factors AlgU and SigX, suggesting a link
65 between the regulation of the cell shape and the reorganization of cytoskeletal-like structures
66 in response to Pf4 superinfective phage variant infection.

67 Consistent with a role in *P. aeruginosa* pathogenesis, Pf4 phage has been shown to
68 contribute to the virulence of *P. aeruginosa* infections in animal models of acute lung infection
69 (Rice et al., 2009; Secor et al., 2017a). Indeed, mice infected with a *P. aeruginosa* strain that
70 was deleted for production of Pf4 phages survived significantly longer than those infected with
71 its isogenic wild-type strain, suggesting that Pf4 contributes to the virulence of *P. aeruginosa*
72 PAO1 (Rice et al., 2009). However, using a different approach, in which Pf4 filamentous phage
73 was added to *P. aeruginosa* PAO1 cultures with the aim to investigate how *P. aeruginosa*
74 biofilm-produced Pf4 phages affect pathogenesis, Secor and colleagues (2017) showed that
75 Pf4-infected PAO1 showed reduced bacterial cytotoxicity and virulence in the lungs of mice
76 (Secor et al., 2017a). In addition, acute infection of *P. aeruginosa* by Pf4 bacteriophage
77 inhibited the production of the virulence factor pyoverdine (Secor et al., 2017b), suggesting that
78 other bacterial phenotypes important for infection pathogenesis are affected by Pf4 phages
79 infection. The aim of this study is to get further insights into the relations linking filamentous
80 phage infection and *P. aeruginosa* virulence. Pf4 superinfective phages addition to *P.*
81 *aeruginosa* H103 strain reduced the virulence on *Caenorhabditis elegans* and cytotoxicity on
82 A549 cells, at least partly by lowering the production of major virulence factors. Alterations of
83 QS, as well as of expression of master QS regulators, suggest that Pf4-variant infection might
84 result in complex networks dysregulations, leading to reducing acute virulence in *P.*
85 *aeruginosa*.

86

87 RESULTS

88

89 **Pf4-variant infection of *P. aeruginosa* H103 reduced virulence, cytotoxicity and** 90 **production of major virulence factors**

91 We first investigated the effect of Pf4 phage variant infection on the virulence model
92 *Caenorhabditis elegans* using the slow-killing assay. As shown in Figure 1A, Pf4-T H103 were
93 significantly less virulent than H103 towards *C. elegans*, since 50% ($P<0.0001$) of the
94 population of nematodes feed with Pf4-T H103 was still alive after 17 days compared to the
95 death of worms seeded in a lawn of H103 after only 5 days. In addition, the lactate
96 dehydrogenase (LDH) release assay revealed that Pf4-T H103 bacteria were about 30%
97 ($P<0.01$) less cytotoxic to A549 lung cells compared to H103 Pf4 non-treated used as the
98 control condition (Figure 1B). Next, we addressed whether the observed *P. aeruginosa*
99 virulence reduction upon exposure to Pf4 phage variant is due to decreased virulence factors
100 production. As shown in Figure 1C, pyocyanin and elastase production levels were lowered by
101 about 60% ($P<0.001$) in response to Pf4 infection. Accordingly, qRT-PCR results showed that
102 the expression of *phzA1/phzA2* involved in the biosynthetic pathway of pyocyanin production
103 and *lasB* encoding for elastase B was strongly down-regulated in response to Pf4 phage
104 infection (Figure 1D). In addition, reduced transcription levels of *rhlA* and *lecA*, which are
105 involved in rhamnolipids and lectin PA-1L production, respectively, was observed (Figure 1D).
106 Overall, these results demonstrate that Pf4 phage variant infection restricts *P. aeruginosa*
107 virulence towards *C. elegans* and A549 infection models and decreases the gene expression and
108 production of virulence factors, which are known to be QS-regulated.

109

110 **Pf4 phage variant infection of *P. aeruginosa* affects the AHL-based QS system**

111 Since most of the virulence factors are regulated by the three QS systems in *P. aeruginosa*
112 (Williams and Camara, 2009), we suspected that QS might be altered in response to Pf4
113 infection. To detect the presence of AHLs QS molecules in the supernatant of *P. aeruginosa*
114 infected with the Pf4 variant, bioluminescence assays were conducted using the AHL-based
115 biosensor *Escherichia coli* harboring the pSB401 plasmid (Winson et al., 1998). Figure 2A
116 shows a bioluminescence decrease of 33% at the bioluminescence peak (8h15) when H103
117 strain was exposed to superinfective Pf4, compared to untreated H103, indicating that Pf4
118 infection resulted in lower AHLs molecules production by *P. aeruginosa*. We next assayed the
119 expression of *lasR* and *rhlR* encoding the transcriptional regulators and the corresponding
120 autoinducers biosynthetic enzymes (*lasI* and *rhlI*, respectively) of the Las and Rhl QS systems.

121 As shown in Figure 2B, expression of *lasI*, but not of *lasR*, was increased in response to Pf4
122 infection. On the other hand, *rhlR* transcription was decreased by 4.2-fold, while *rhlI* expression
123 remained unchanged. Noticeably, both the Las and Rhl systems are negatively regulated by the
124 orphan LuxR-type receptor QscR, which binds to 3-oxo-C₁₂-HSL, the native ligand for LasR
125 (Schuster and Greenberg, 2006). As depicted in Figure 2B, expression of *qscR* was strongly
126 enhanced, which may explain at least partly, the reduced virulence of *P. aeruginosa* when
127 treated with Pf4 phage variant. Recently, the anti-activation phenotype of QscR was
128 demonstrated to rely upon its regulation of the operon PA1895-1897 by direct binding of the
129 regulator to the PA1897 promoter region (Ding et al., 2018). Our results demonstrated that
130 PA1897 expression was increased in response to Pf4 infection (Figure 2B). Taken together, our
131 data demonstrate that Pf4 phage infection induces decreased AHLs QS molecules production
132 in *P. aeruginosa*. Therefore, the reduced virulence factors production and virulence phenotype
133 of *P. aeruginosa* cells exposed to Pf4 seems to be mediated by QscR through Las and Rhl AHL-
134 based QS systems.

135

136 ***P. aeruginosa* infection by Pf4 phage variant triggers decreased HAQ QS-molecules** 137 **production**

138 A strategy based on another biosensor was used to assess the production of HAQs in response
139 to Pf4 infection, in which a *luxCDABE*-based *pqsA* promoter fusion was introduced into a non-
140 coding site in the chromosome of a *P. aeruginosa* PAO1 *pqsA* mutant using the mini-CTX
141 *luxCDABE* plasmid system (Fletcher et al., 2007). As shown in Figure 3A, Pf4 infection of
142 H103 resulted in decreased bioluminescence production (46% at the bioluminescence peak, i.e.
143 5h45), compared to untreated bacteria, indicating reduced HAQs production upon Pf4 phage
144 exposure. We further assayed by qRT-PCR the expression of *pqsR* encoding the transcriptional
145 regulator of the PQS QS systems and *pqsA* that encodes the first enzyme involved in HAQs
146 biosynthesis. As shown in Figure 3B, expression of both *pqsR* and *pqsA* was reduced by 1.6-
147 and 4.6-fold, respectively, indicating that the HAQ QS system was also affected when *P.*
148 *aeruginosa* was infected with Pf4 phage variant. Since HHQ/PQS enhance the overall
149 expression of the Rhl QS system, thus modulating the *rhl*-dependent phenotypes, including
150 PA1-L lectin and pyocyanin (Pesci et al., 1999; McKnight et al., 2000; Schuster and Greenberg,
151 2007), the lower production of HAQ could at least partly account for the reduced expression
152 and activity of the Rhl QS system. To get further insights into the lower production of HAQs,
153 we further assayed the expression of the small noncoding RNA (sRNA) PhrS. PhrS is a
154 stationary phase induced sRNA (Sonnleitner et al., 2011), which is associated to *pqsR*

155 translation, leading to increased transcription of the PqsR target genes and elevated pyocyanin
156 and PQS levels (Sonnleitner et al., 2011; Brouwer et al., 2014). As shown in Figure 3B, *phrS*
157 expression was reduced by 2.2-fold when *P. aeruginosa* was infected with Pf4 phage compared
158 to untreated bacteria, which may account for the observed lower HAQs production. Altogether,
159 our data suggest that the PQS QS system and the sRNA PhrS contribute to a certain extent to
160 the altered *P. aeruginosa* virulence phenotype in response to Pf4 phage infection.

161

162 **Pf4 phage variant infection leads to cAMP/Vfr signaling pathway alteration**

163 In the final part of the current study, we looked at the cAMP/Vfr signaling pathway, which is
164 reported to modulate the QS response (Wolfgang et al., 2003). Therefore, we assayed the
165 expression of *cyoA* and *cyoB*, both encoding adenylate cyclases (Fulcher et al., 2010; Inclan et
al., 2011) t

189 that Pf4 affects bacterial virulence. Conversely, other data showed that mice infected with a *P.*
190 *aeruginosa* strain deleted for Pf4 production survived significantly longer than those infected
191 with its isogenic wild-type strain, suggesting that Pf4 prophage may contribute to the virulence
192 of *P. aeruginosa* PAO1 (Rice et al., 2009). We also demonstrated that both the AHL and the
193 HHQ/PQS branches of the *P. aeruginosa* QS were affected by the Pf4 phage infection. Since
194 HHQ/PQS enhances the overall expression of the *rhl* QS system, thus modulating the *rhl*-
195 dependent phenotypes, including PA1-L lectin and pyocyanin (Pesci et al., 1999; McKnight et
196 al., 2000; Schuster and Greenberg, 2007), the lower production of HAQs could contribute to
197 the reduced expression and activity of the Rhl QS system. A decreased AHL production was
198 observed despite increased *lasI* transcription. The observed decrease of *rhlR* expression
199 suggests that mostly the production of C₄-HSL is reduced. On the other hand, an increased 3-
200 oxo-C₁₂-HSL production, resulting from higher *lasI* expression, could trigger increased QscR
201 activity since QscR preferentially binds this signal molecule (Lequette et al., 2006; Ding et al.,
202 2018).

203 QscR indeed reduces virulence factor production in *P. aeruginosa* (Weng et al., 2014), while a
204 QscR-null mutant is hypervirulent in an insect model (Chugani et al., 2001). This effect was
205 mediated via the increased expression of the QscR direct target PA1897-1895 operon (Ding et
206 al., 2018), which was also enhanced in response to Pf4 phage infection. Altogether, our study
207 showed that Pf4 infection resulted in altered QS signalling and activity (depicted on Figure 5).
208 Remarkably, in a previous study, we have shown that Pf4 infection of *P. aeruginosa* induced a
209 strong cell wall stress response in *P. aeruginosa*, which was triggered by both AlgU and SigX
210 ECF σ factors (Tortuel et al., 2020). The AlgU regulatory cascade can contribute to the
211 diminution of virulence and virulence factors production. Inactivation of MucA, the AlgU anti-
212 sigma, results in increased AlgU activity that has been previously associated with reduced
213 expression of numerous acute virulence factors, including LasA protease and TFP (Mohr et al.,
214 1990; Wu et al., 2004; Jones et al., 2010; Pritchett et al., 2015). AlgU is also known to be an
215 activator of the AlgR regulator, which in turn represses Vfr. Since Vfr was previously shown
216 to directly activate transcription of *rhlR* (Albus et al., 1997; Croda-Garcia et al., 2011), one can
217 assume that lower abundance levels of Vfr could also contribute to the *rhlR* transcription
218 decrease that was observed in Pf4 infected *P. aeruginosa*. In addition to indirectly influencing
219 QS through reduced *vfr* expression, AlgR has also been shown to directly negatively regulate
220 expression of *rhlI* and *rhlR* (Morici et al., 2007). In addition, AlgR activates also CzcR, which
221 negatively regulate phenazine genes transcription (Dieppois et al., 2012), and *czcR* expression
222 was decreased in response to Pf4 phage infection (Supplementary Figure 1). On the other side,

223 the important SigX activation upon Pf4 infection could also affect *P. aeruginosa* virulence
224 factors production. In an *oprF* mutant, in which SigX was activated, production of C₄-HSL QS
225 molecule was delayed and PQS was decreased (Fito-Boncompte et al., 2011). In addition, SigX
226 activity was shown to cause an increased membrane fluidity (Tortuel et al., 2020), which could
227 possibly influence the production/diffusion of QS signal molecules. Indeed, a phospholipid *lptA*
228 mutant induces membrane stiffness in *P. aeruginosa*, which results in strong and early
229 production of the C₄-HSL QS molecule (Baysse et al., 2005). It is therefore tempting to
230 hypothesize that in the opposite situation (increased membrane fluidity due to SigX
231 hyperactivity), the levels of C₄-HSL would be decreased by an unknown mechanism, in line
232 with the results presented herein.

233 *P. aeruginosa* can also regulate virulence via Vfr upon surface contact using TFP as
234 mechanosensors through the Chp chemosensory system (Persat et al., 2015). Numerous
235 virulence factors are indeed up-regulated in response to surface contact (Siryaporn et al., 2014;
236 Luo et al., 2015). The stimulation of the Chp system regulates CyaB adenylate cyclase activity,
237 which is involved in cAMP production (Wolfgang et al., 2003) that is required for Vfr activity.
238 We show herein that Pf4 phage infection led to increased expression of *cyaB* suggesting an
239 increase of cAMP production, which in turn would activate Vfr, despite lower transcription of
240 its gene. This seems to be the case since Vfr direct targets *exsA* and *toxA* showed increased
241 expression. Noticeably, in a *sigX*-overexpressing *P. aeruginosa* PA14 strain, *exsA* was
242 upregulated, in line with our data (Blanka et al., 2014). In addition, transcription of ExsA targets
243 *exoS* and *exoT* was enhanced, suggesting that ExsA was active in response to Pf4 infection.
244 However, the sRNA PhrS that affects PqsR translation (Sonnleitner et al., 2011), is also an
245 ExsA direct target, and *phrS* expression was reduced herein. Altogether, these data suggest that
246 Pf4 infection led to reduced global virulence and cytotoxicity, most probably as result of lower
247 production of virulence factors and altered QS signaling pathways. In addition, these data also
248 suggest either that T3SS effectors, despite more expressed were not produced, or that the T3SS
249 systems was not active. Since Pf4 infection led to increased SigX activity, as shown by the
250 enhanced membrane fluidity of *P. aeruginosa*, and since we have shown in a previous study
251 that membrane fluidity alterations resulted in impaired carbon metabolism possibly through
252 altered membrane functionalities as nutrients transporters inefficiency (Flécharde et al., 2018),
253 it is possible that the T3SS machinery would be less efficient.

254 Moreover, the Chp chemosensory system is required for full surface pilin assembly and TFP
255 extension–retraction (Persat et al., 2015) leading to TFP-mediated twitching motility
256 (Whitchurch et al., 2004). Since TFP are Pf4 phages receptors, we hypothesize that Pf4

257 attachment to TFP would restrict their functionality, reducing their extension-retraction, as
258 demonstrated by the complete loss of twitching motility of Pf4-T *P. aeruginosa* (Tortuel et al.,
259 2020). Altogether, these data suggest that the Chp/TFP/Vfr pathway might be altered in *P.*
260 *aeruginosa* in response to Pf4 infection, a hypothesis that requires further investigations. In
261 addition, Pf4 infection led to increased c-di-GMP production (Tortuel et al., 2020), a second
262 messenger whose production is known to repress cAMP production independently of inhibition
263 of adenylate cyclases (Almblad et al., 2015). On the other side, we have shown previously that
264 Pf4 infection resulted in increased *pel*, but not *psl* matrix exopolysaccharides expression
265 (Tortuel et al., 2020). Interestingly, c-di-GMP-dependent Pel production enhances the TFP-
266 mediated surface attachment (Ribbe et al., 2017), and the shear force in flowing fluid sensed by
267 PilY1 and TFP provides a cue for the stimulation of c-di-GMP levels and surface attachment
268 (Rodesney et al., 2017). It is tempting to speculate that the attachment of Pf4 phages onto TFP,
269 almost perpendicularly to the cell envelope, would generate some shear force leading to c-di-
270 GMP production and adenylate cyclase-independent cAMP decrease. Thus, mechanosensing
271 via TFP upon initial attachment induces the production of c-di-GMP and c-di-GMP-dependent
272 gene expression via complex regulatory networks and thereby determines bacterial lifestyles
273 upon surface adhesion. Further work will be needed in order to dissect and clarify the
274 interactions in this complex regulatory network.

275 **EXPERIMENTAL SECTION**

276 **Bacterial strains, media, and growth conditions.** Bacterial strains used in this study are listed
277 in Supplementary Table S1. For planktonic cultures, *P. aeruginosa* H103 were inoculated in
278 LB medium (50 mM NaCl) at an initial absorbance at 580nm (OD_{580nm}) of 0.08. Bacteria were
279 grown at 37 °C with orbital shaking at 180 r.p.m for 5h (wild-type) or 7h (Pf4-T) ($OD_{580nm} =$
280 ~ 2.8). For infection experiments, Pf4 was added to the planktonic cultures at 1.5×10^9
281 phages.mL⁻¹ (final concentration). All experiments were performed independently at least four
282 times.

283

284 **Pf4 phages production.** Pf4 phages were obtained as previously described (Tortuel et al.,
285 2020). Briefly, the screening of a transposon mutant library generated for another purpose led
286 to the identification of dH103Pf4⁺, a transposon mutant displaying a colony lysis phenotype
287 and overproducing Pf4 phages. To obtain Pf4 phages, the mutant dH103Pf4⁺ was grown for 24
288 h at 37 °C, then 1 mL of the planktonic culture was harvested and centrifuged at 8000 x g for 5
289 min. The supernatant was next filtered using a filter with 0.22 µm pore size and stored at 4 °C
290 until use.

291

292 **Quantitative reverse-transcription real-time PCR (qRT-PCR) analyses.** Total RNAs from
293 non-treated and treated Pf4 phages cultures were extracted using the hot acid-phenol method
294 (Bouffartigues et al., 2012). Genomic DNA contamination was removed from total RNAs by
295 using rigorous treatment with RNA-free Turbo DNaseI kit (Invitrogen, United States) following
ma

309 **Elastase quantification assay.** Elastase activity was quantified from 50 μ L filtered
310 supernatants of *P. aeruginosa* cultures untreated or treated with Pf4 phage variant. Supernatants
311 were mixed with 20 mg of elastase congo red (Sigma-Aldrich) and 1 mL of Tris buffer (100
312 mM Tris, 1mM CaCl₂, pH 7.2), then incubated 18h at 37°C with shaking. Reaction was stopped
313 with 100 μ L of EDTA, and after centrifugation, the absorbance of the supernatants was
314 measured at 490nm and normalized to the OD_{580nm}.

315

316 **Pyocyanin quantification assay.** Pyocyanin was quantified from supernatants of *P.*
317 *aeruginosa* cultures untreated or treated with Pf4 phage variant. Briefly, the phenazine pigment
318 was extracted from cell-free culture supernatants with 1 ml of chloroform by vortexing. The
319 chloroform phase was then extracted with 500 μ L of 0.2 N HCl. The absorbance of the aqueous
320 phase was measured at 520nm and normalized to the OD_{580nm}.

321

Cytotoxicity assay on A549 cell-line. The human lung A

343 the NGM agar plates was homogeneous and visually similar for each condition tested. The
344 plates were cooled to room temperature for 4 h, and 20 to 30 L4- synchronized worms were
345 placed on the plates and incubated at 22°C. Worm survival was scored daily for 32 days using
346 an Axiovert S100 optical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a digital
347 camera (DXM 1200F; Nikon Instruments, Melville, NY). An assay consisted of three
348 independent replicates (plates). The virulence value (the number of dead worms) of each
349 bacterial strain was the mean of four independent assays. For killing assay, nematode survival
350 was calculated by the Kaplan-Meier method, and the significance of survival differences was
351 tested using the log rank test (Prism software, version 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA).

352

353 **Extraction and quantification of AHLs and HAQs QS-molecules production.** Cultures of
354 *P. aeruginosa* H103 untreated and treated with Pf4 phage variant were subjected to AHL- and
355 HAQ-molecules extraction following the technique described previously (Fletcher et al., 2007).
356 AHLs and HAQs quantification was performed using the biosensor strains *Escherichia coli*
harboring the plasmid pSB401 (*l*

376 **ACKNOWLEDGEMENTS**

377 The LMSM is supported by the Région Normandie (France), Evreux Portes de Normandie
378 (EPN, France) and European FEDER funds. D.T., M.C. and A.D. are supported by doctoral
379 fellowships from the Région Normandie (France). A.T. is supported by a post-doctoral
380 fellowship from European Union (FEDER) and Région Normandie (France). C. A. was the
381 recipient of a postgraduate fellowship from Campus France and FUNAI (Nigeria). The funders
382 had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit this
383 work for publication.

384 **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

385 The authors declare no conflict of interest.

386

387 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

388

389 E.B., S.C. and D.T. designed the experiments. D.T. M.C, A.T., E.B., O.M., A.D., O.C.A., O.L.
390 and S.C conducted experiments and analyzed the data. E.B., S.C., P.C., D.T., O.L., A.T., M.F.
391 and N.O. contributed to the writing of the manuscript.

392

393 **FIGURE LEGENDS**

394

395 **Figure 1. *P. aeruginosa* H103 treated by Pf4 phage variant display decreased virulence**
396 **phenotype.**

397 A. Kaplan-Meier survival plots of *C. elegans* nematodes in contact of *P. aeruginosa* H103
398 (n=67) or Pf4-T condition (n=123). Statistics were achieved by pairwise comparison (log rank
399 test). B. Cytotoxicity effect of Pf4 phage variant in A549 lung cells after 20h infection. C.
400 Pyocyanin and elastase production in *P. aeruginosa* H103 and Pf4-T conditions. D. Relative
401 mRNA expression levels of *phzA1*, *phzA2*, *lasB*, *rhlA* and *lecA* in *P. aeruginosa* H103 and Pf4-
402 T conditions as determined by RT-qPCR experiments. Data are displayed as the mean \pm SEM
403 of least four biological independent assays. Statistics were achieved by paired (two samples)
404 two-tailed *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

405

406 **Figure 2. The superinfective Pf4 phage variant infection trigger AHLs production**
407 **decrease and QS genes dysregulation.**

408 A. AHL-based QS molecules detection in *P. aeruginosa* H103 (green curve) and PF4-T (violet
409 curve) conditions using the bioluminescence *E. coli* pSB401 reporter strain. The 3-oxo-C₁₂-
410 HSL (blue curve) and C₄-HSL (yellow curve) synthetic standards used as positive controls and
411 the negative control (no AHLs added) (black curve) are displayed. Histograms represents values
412 at the peak of bioluminescence, i.e. 8h15. B. Relative mRNA expression levels of *lasI*, *lasR*,
413 *rhlI*, *rhlR*, *qscR* and PA1897 in *P. aeruginosa* H103 and Pf4-T conditions \pm SEM as determined
414 by RT-qPCR experiments. Each experiment was assayed at least four times independently.
415 Statistics were achieved by paired (two samples) two tailed *t*-test. ^{NS} $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** p
416 < 0.01 ; *** $p < 0.001$.

417

418 **Figure 3. Effect of Pf4 phage variant on HAQ-based QS system .**

A. Bioluminescence production of *P. aeruginosa* PA

427 **Figure 4. Treatment by Pf4 phage variant leads to a decrease of *vfr* expression through**
428 **AlgU/AlgR activity.**

429 Relative mRNA expression levels of *cyaA*, *cyaB*, *vfr*, *toxA*, *exsA*, *exoS*, *exoT* and *pilA* in *P.*
430 *aeruginosa* H103 and Pf4-T conditions \pm SEM as determined by RT-qPCR experiments. Each
431 experiment was assayed at least four times independently. Statistics were achieved by paired
432 (two samples) two-tailed *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

433

434 **Figure 5. Pf4 phage variant infection altered *P. aeruginosa* H103 virulence regulatory**
435 **circuits.**

436 The data of this study suggest that Pf4 phage variant leads to decreased virulence in *P.*
437 *aeruginosa* H103 towards *C. elegans* infection model which can be associated with a reduction
438 of virulence factors production. Remarkably, the three QS systems (*Las*, *Rhl*, and *Pqs*) were
439 shown to be altered upon exposure to Pf4 phage variant. The AHLs and HAQs QS molecules
440 production was shown to be reduced which possibly explain the observed decrease of QS-
441 regulated genes expression and their encoding products such as pyocyanin and elastase. The
442 QscR activity, sRNA PhrS, and cAMP/Vfr signalling pathway appears to be associated with
443 QS systems and to be also involved in the response to Pf4 phage variant infection.

444

445 **Supplementary Figure 1. Expression of *czcR* gene.**

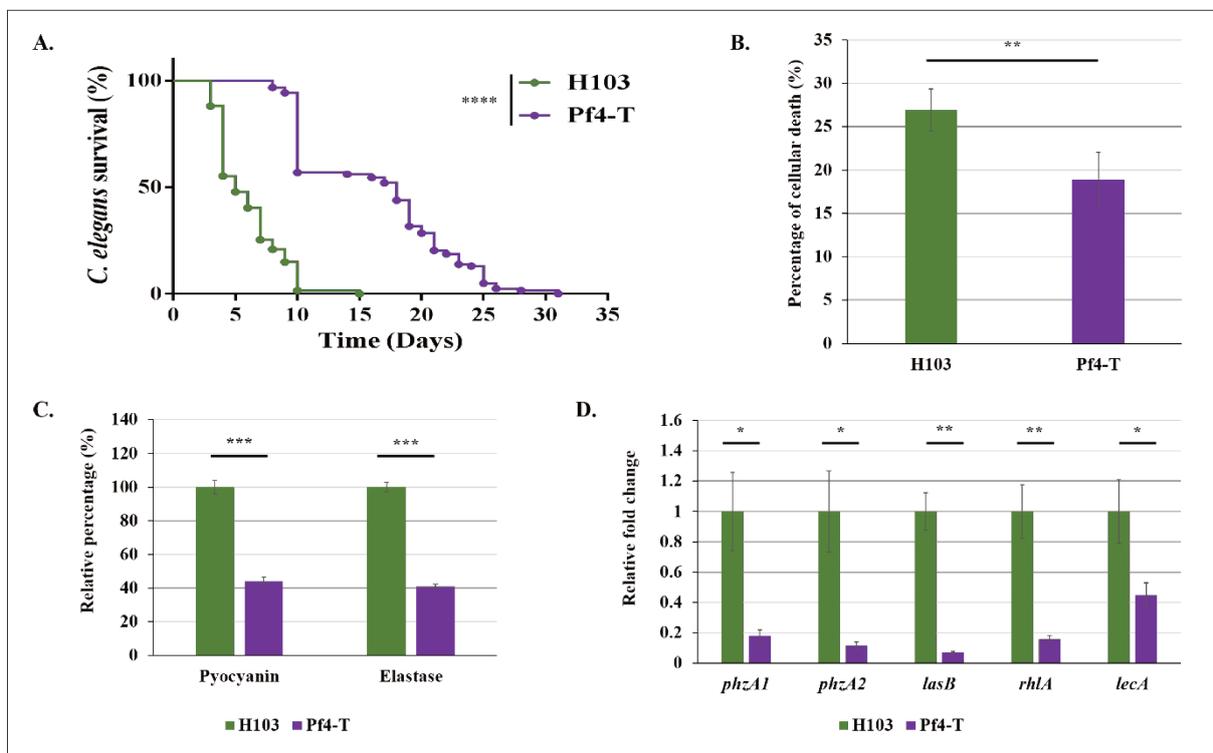
446 Relative mRNA expression levels of *czcR* in *P. aeruginosa* H103 and Pf4-T conditions \pm SEM
447 as determined by RT-qPCR experiments. This experiment was assayed four times
448 independently. Statistics were achieved by paired (two samples) two-tailed *t*-test. ** $p < 0.01$.

449

450 **FIGURES**

451

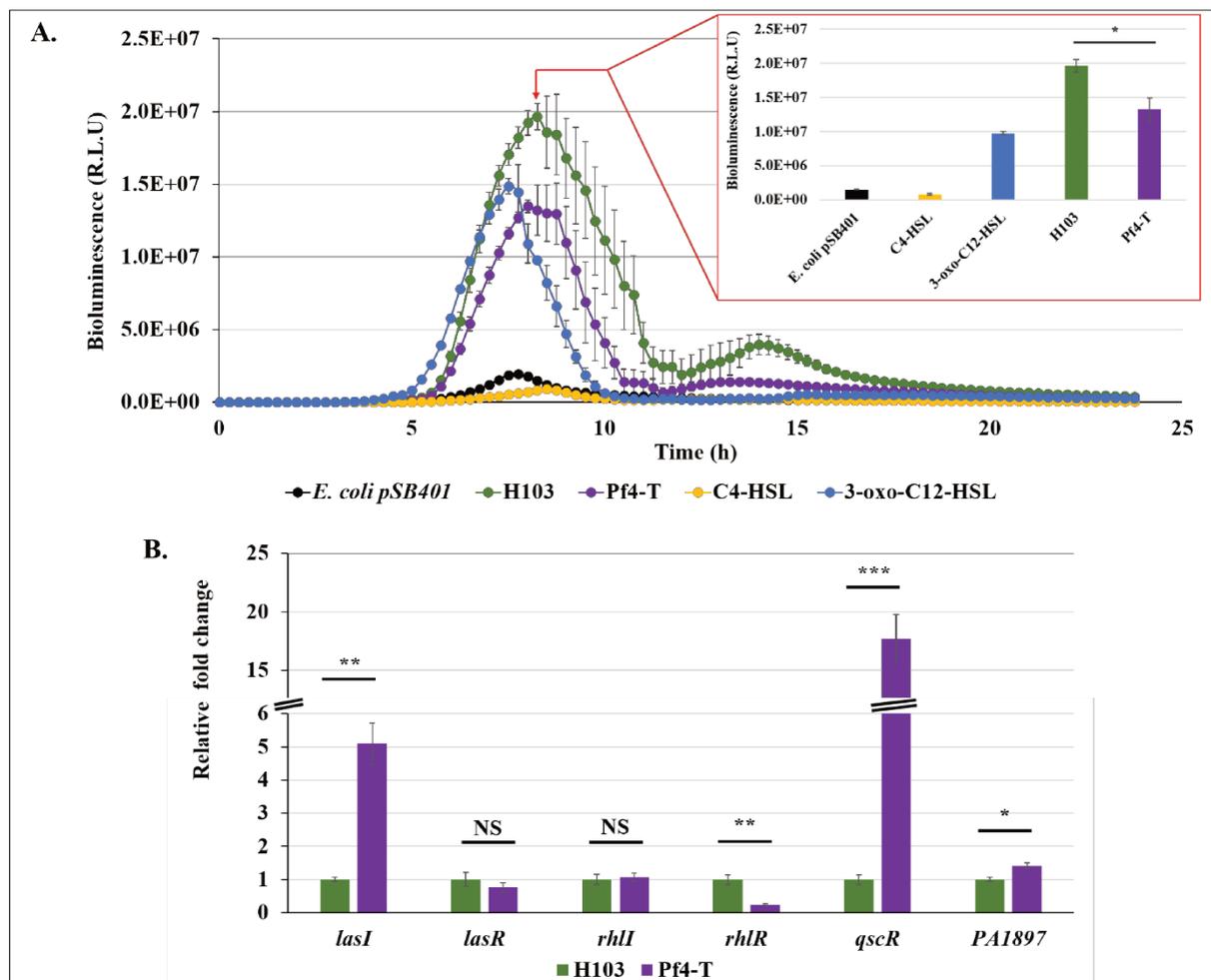
452 **Figure 1.**



453

454

455 **Figure 2.**

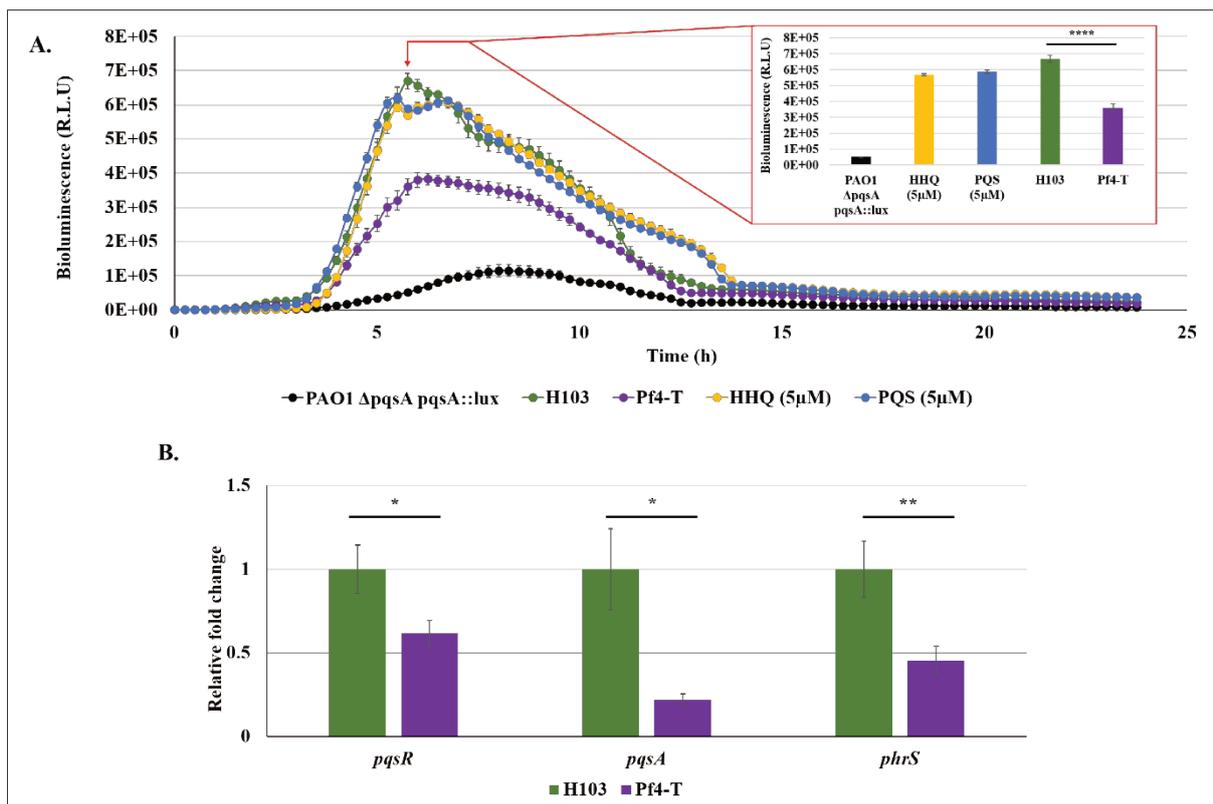


456

457

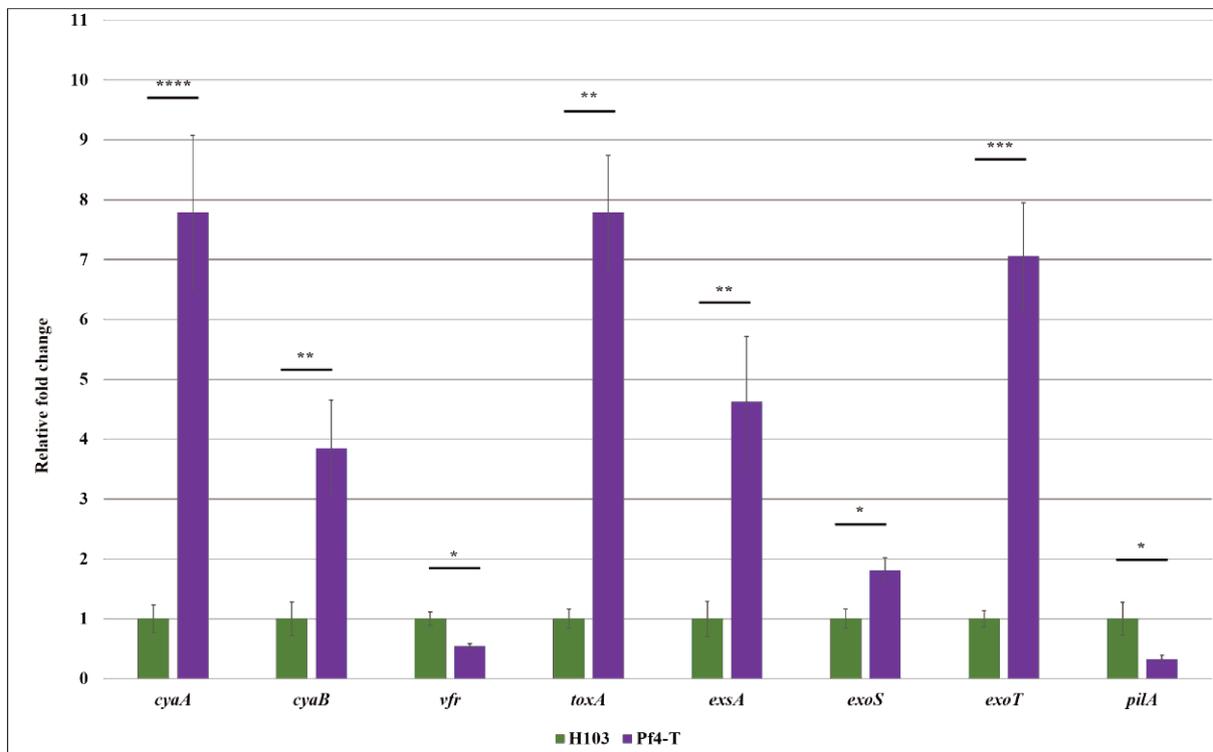
458

Figure 3.



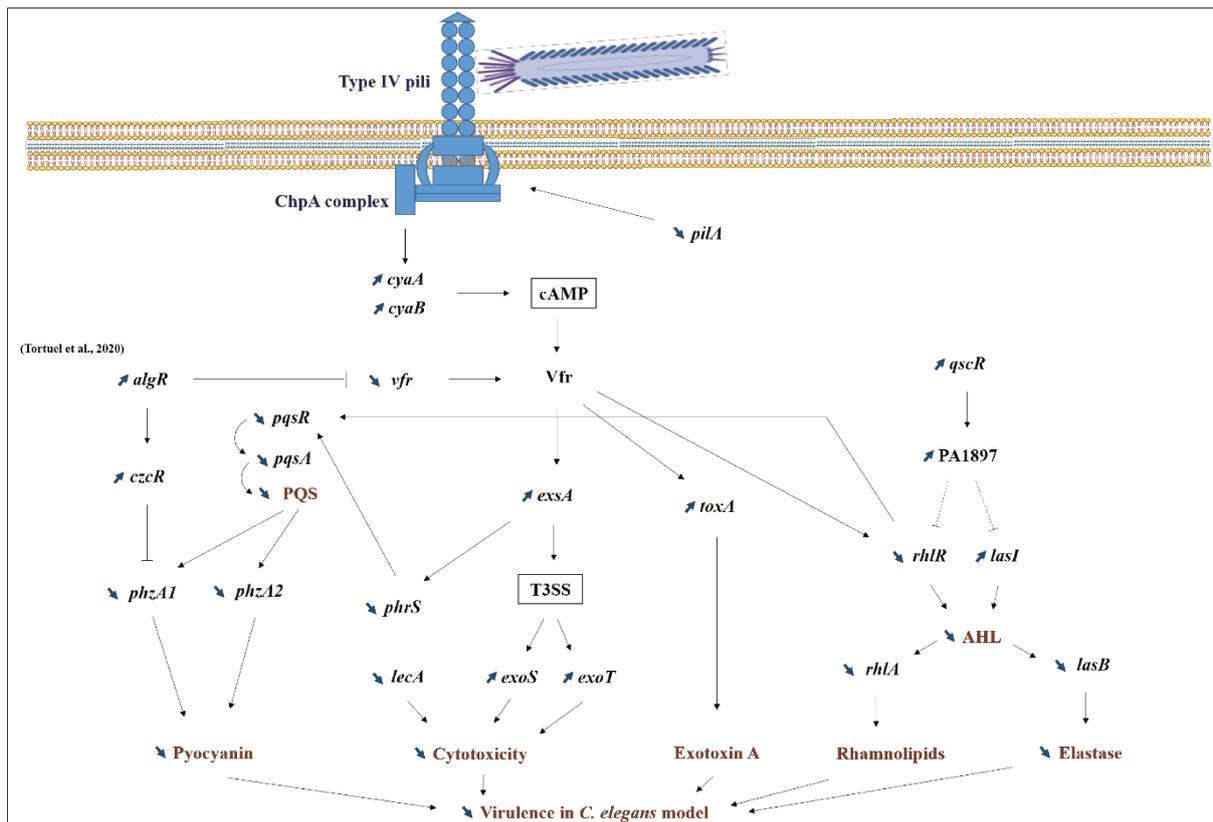
459
460
461

Figure 4.



462
463
464

Figure 5.

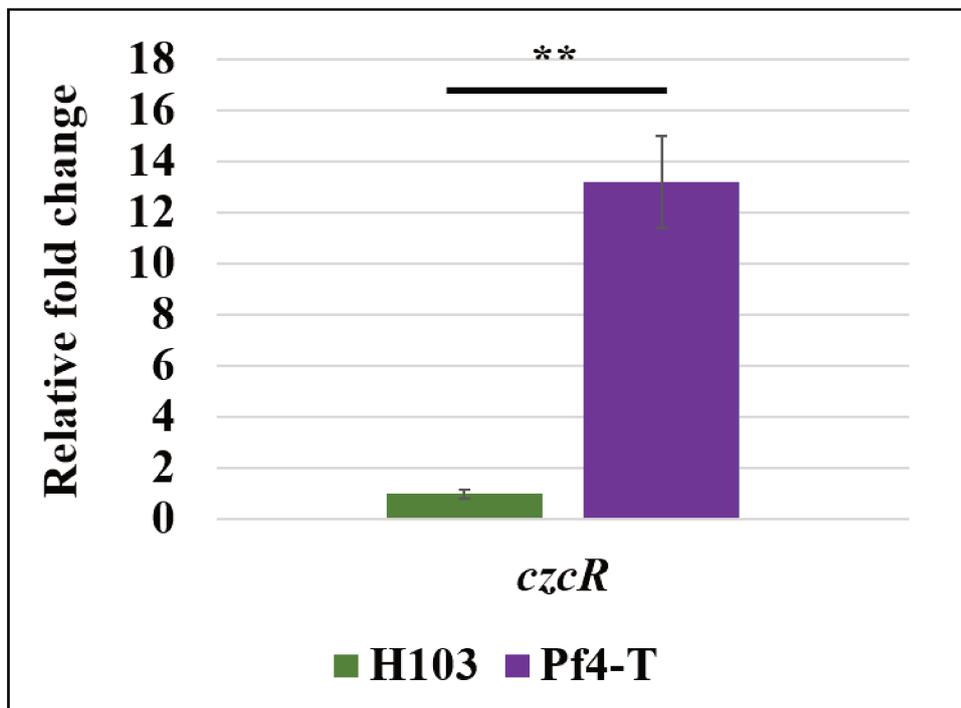


465

466

467

Supplementary Figure 1.



468

469

470

TABLES

471

472 **Table S1. Strains used in this study**

Strains	Relevant characteristics	Sources
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H103	Wild-type strain; prototroph derivative of PAO1	(Hancock and Carey, 1979)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO		

475 **Table S2. Primers used in this study**

PA number	Gene name	Primer name	Sequence (
-----------	-----------	-------------	------------

		phrS-R	CCTTGCGTGCTCTGTGTATC
PA3476	<i>rhlI</i>	rhlI-F	GGCTGGGACTTGGCGTAG
		rhlI-R	GGCTGGGACTTGGCGTAG
PA3477	<i>rhlR</i>	rhlR-F	CTGGGCTTCGATTACTACGC
		rhlR-R	CCCGTAGTTCTGCATCTGGT
PA3479	<i>rhlA</i>	rhlA-F	AACATTTCAACGTGGTGCTG
		rhlA-R	ATTCCACCTCGTCGTCCTT
PA3724	<i>lasB</i>	lasB-F	AACCGTGCGTTCTACCTGTT
		lasB-R	TGGTGGCGGTCCAGTAGTA
PA3841	<i>exoS</i>	exoS-F	TCTCTACACCGGCATTCACTAC
		exoS-R	CCTTGGTCGATCAGCTTTTG
PA4210	<i>phzA1</i>	phzA1-F	AACCACTACATCCATTCCTTCG
		phzA1-R	CGGCTATTCCCAATGCAC
PA4525	<i>pilA</i>	pilA-F	ACCCGCTGAAGACCACTGTT
		pilA-R	CGGTTCGCAGTAGAAGCAGTAGTAC
PA5272	<i>cyaA</i>	cyaA-F	CGCTTCAAGGAGCAGGTATT
		cyaA-R	GAGATGGCGATAGACCAGGA

476

477

478 **REFERENCES**

- 479 Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., and Iglewski, B.H. (1997). Vfr
480 controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3928-3935. doi:
481 10.1128/jb.179.12.3928-3935.1997.
- 482 Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G., et al. (2005).
483 Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and
484 impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174, 3643-3649. doi:
485 10.4049/jimmunol.174.6.3643.
- 486 Almblad, H., Harrison, J.J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M.R., et al. (2015).
487 The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by
488 Cyclic Di-GMP. *J Bacteriol* 197, 2190-2200. doi: 10.1128/JB.00193-15.
- 489 Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., et al.
490 (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration
491 of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529-2542. doi: 10.1099/mic.0.28185-0.
- 492 Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., and Mattick, J.S. (2002).
493 Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in
494 *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 3605-3613. doi: 10.1128/jb.184.13.3605-
495 3613.2002.
- 496 Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., et al. (2014).
497 Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for
498 *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* 196, 345-356. doi:
499 10.1128/JB.01034-13.
- 500 Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., et al. (2012).
501 Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the
502 SigX sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* 194, 4301-4311. doi:
503 10.1128/JB.00509-12.
- 504 Branski, L.K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M.G., Sanford, A.P., and Herndon, D.N.
505 (2009). Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397. doi:
506 10.1089/sur.2009.024.
- 507 Brouwer, S., Pustelny, C., Ritter, C., Klinkert, B., Narberhaus, F., and Haussler, S. (2014). The
508 PqsR and RhlR transcriptional regulators determine the level of *Pseudomonas*
509 quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different
510 *pqsABCDE* mRNA isoforms. *J Bacteriol* 196, 4163-4171. doi: 10.1128/JB.02000-14.
- 511 Burgener, E.B., Sweere, J.M., Bach, M.S., Secor, P.R., Haddock, N., Jennings, L.K., et al.
512 (2019). Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung
513 infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 11(488). doi:
514 10.1126/scitranslmed.aau9748.
- 515 Caldwell, C.C., Chen, Y., Goetzmann, H.S., Hao, Y., Borchers, M.T., Hassett, D.J., et al.
516 (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway
517 pathogenesis. *Am J Pathol* 175, 2473-2488. doi: 10.2353/ajpath.2009.090166.
- 518 Castang, S., and Dove, S.L. (2012). Basis for the essentiality of H-NS family members in
519 *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 194, 5101-5109. doi: 10.1128/JB.00932-12.
- 520 Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P.
521 (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in
522 *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2752-2757. doi:
523 10.1073/pnas.051624298.
- 524 Croda-Garcia, G., Grosso-Becerra, V., Gonzalez-Valdez, A., Servin-Gonzalez, L., and
525 Soberon-Chavez, G. (2011). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa*
526 *rhlR*: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing

- 527 regulators LasR and RhlR. *Microbiology* 157, 2545-2555. doi: 10.1099/mic.0.050161-
 528 0.
- 529 Dieppois, G., Ducret, V., Caille, O., and Perron, K. (2012). The transcriptional regulator CzcR
 530 modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS*
 531 *One* 7, e38148. doi: 10.1371/journal.pone.0038148.
- 532 Ding, F., Oinuma, K.I., Smalley, N.E., Schaefer, A.L., Hamwy, O., Greenberg, E.P., et al.
 533 (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* Orphan Quorum Sensing Signal Receptor QscR
 534 Regulates Global Quorum Sensing Gene Expression by Activating a Single Linked
 535 Operon. *MBio* 9(4). doi: 10.1128/mBio.01274-18.
- 536 Engel, J., and Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in
 537 disease. *Curr Opin Microbiol* 12, 61-66. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.007.
- 538 Fishman, J.A. (2011). Infections in immunocompromised hosts and organ transplant recipients:
 539 essentials. *Liver Transpl* 17 Suppl 3, S34-37. doi: 10.1002/lt.22378.
- 540 Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel,
 541 G., et al. (2011). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect*
 542 *Immun* 79, 1176-1186. doi: 10.1128/IAI.00850-10.
- 543 Fletcher, M.P., Diggle, S.P., Camara, M., and Williams, P. (2007). Biosensor-based assays for
 544 PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nat*
 545 *Protoc* 2, 1254-1262. doi: 10.1038/nprot.2007.158.
- 546 Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Jones, A.K., Fulcher, N.B., Urbanowski, M.L., Yahr, T.L., et al.
 547 (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor
 548 expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol*
 549 192, 3553-3564. doi: 10.1128/JB.00363-10.
- 550 Fulcher, N.B., Holliday, P.M., Klem, E., Cann, M.J., and Wolfgang, M.C. (2010). The
 551 *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP
 552 levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol Microbiol* 76, 889-904. doi:
 553 10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x.
- 554 Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., et al. (2013).
 555 The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-
 556 related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8, e80407. doi:
 557 10.1371/journal.pone.0080407.
- 558 Hancock, R.E., and Carey, A.M. (1979). Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-
 559 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* 140, 902-910.
- 560 Inclan, Y.F., Huseby, M.J., and Engel, J.N. (2011). FimL regulates cAMP synthesis in
 561 *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6, e15867. doi: 10.1371/journal.pone.0015867.
- 562 Jones, A.K., Fulcher, N.B., Balzer, G.J., Urbanowski, M.L., Pritchett, C.L., Schurr, M.J., et al.
 563 (2010). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through *muCA*
 564 mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *J Bacteriol* 192, 5709-5717. doi:
 565 10.1128/JB.00526-10.
- 566 Kanack, K.J., Runyen-Janecky, L.J., Ferrell, E.P., Suh, S.J., and West, S.E. (2006).
 567 Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the
 568 *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli*
 569 cAMP receptor protein. *Microbiology* 152, 3485-3496. doi: 10.1099/mic.0.29008-0.
- 570 Kelsey, R. (2019). Filamentous bacteriophages affect pathogenicity of *Pseudomonas* infections
 571 in cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol* 17, 398. doi: 10.1038/s41579-019-0209-2.
- 572 Lau, G.W., Hasset, D.J., and Britigan, B.E. (2005). Modulation of lung epithelial functions by
 573 *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 13, 389-397. doi:
 574 10.1016/j.tim.2005.05.011.

- 575 Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. (2004a). The role of pyocyanin in *Pseudomonas*
 576 *aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10, 599-606. doi:
 577 10.1016/j.molmed.2004.10.002.
- 578 Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi, D. (2004b). *Pseudomonas*
 579 *aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 72, 4275-4278.
 580 doi: 10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004.
- 581 Lequette, Y., Lee, J.H., Ledgham, F., Lazdunski, A., and Greenberg, E.P. (2006). A distinct
 582 QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* 188,
 583 3365-3370. doi: 10.1128/JB.188.9.3365-3370.2006.
- 584 Luo, Y., Zhao, K., Baker, A.E., Kuchma, S.L., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., et al. (2015). A
 585 hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface
 586 behaviors. *MBio* 6. doi: 10.1128/mBio.02456-14.
- 587 Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002). Lung infections associated with cystic
 588 fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222. doi: 10.1128/cmr.15.2.194-222.2002.
- 589 Marsden, A.E., Intile, P.J., Schulmeyer, K.H., Simmons-Patterson, E.R., Urbanowski, M.L.,
 590 Wolfgang, M.C., et al. (2016). Vfr Directly Activates *exsA* Transcription To Regulate
 591 Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *J Bacteriol* 198,
 592 1442-1450. doi: 10.1128/JB.00049-16.
- 593 McElroy, K.E., Hui, J.G., Woo, J.K., Luk, A.W., Webb, J.S., Kjelleberg, S., et al. (2014).
 594 Strain-specific parallel evolution drives short-term diversification during *Pseudomonas*
 595 *aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1419-1427. doi:
 596 10.1073/pnas.1314340111.
- 597 McKnight, S.L., Iglewski, B.H., and Pesci, E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal
 598 regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 2702-2708.
 599 doi: 10.1128/jb.182.10.2702-2708.2000.
- 600 Mohr, C.D., Rust, L., Albus, A.M., Iglewski, B.H., and Deretic, V. (1990). Expression patterns
 601 of genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two
 602 virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol*
 603 *Microbiol* 4, 2103-2110. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00571.x.
- 604 Morici, L.A., Carterson, A.J., Wagner, V.E., Frisk, A., Schurr, J.R., Honer zu Bentrup, K., et
 605 al. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in
 606 a biofilm-specific manner. *J Bacteriol* 189, 7752-7764. doi: 10.1128/JB.01797-06.
- 607 Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015). Type IV pili
 608 mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl*
 609 *Acad Sci U S A* 112, 7563-7568. doi: 10.1073/pnas.1502025112.
- 610 Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., et al.
 611 (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas*
 612 *aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11229-11234. doi:
 613 10.1073/pnas.96.20.11229.
- 614 Petrova, O.E., Schurr, J.R., Schurr, M.J., and Sauer, K. (2011). The novel *Pseudomonas*
 615 *aeruginosa* two-component regulator BfmR controls bacteriophage-mediated lysis and
 616 DNA release during biofilm development through PhdA. *Mol Microbiol* 81, 767-783.
 617 doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07733.x.
- 618 Pritchett, C.L., Little, A.S., Okkotsu, Y., Frisk, A., Cody, W.L., Covey, C.R., et al. (2015).
 619 Expression analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component regulatory
 620 system. *J Bacteriol* 197, 736-748. doi: 10.1128/JB.02290-14.
- 621 Ribbe, J., Baker, A.E., Euler, S., O'Toole, G.A., and Maier, B. (2017). Role of Cyclic Di-GMP
 622 and Exopolysaccharide in Type IV Pilus Dynamics. *J Bacteriol* 199(8). doi:
 623 10.1128/JB.00859-16.

- 624 Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., et al. (2009). The biofilm
625 life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous
626 prophage. *ISME J* 3, 271-282. doi: 10.1038/ismej.2008.109.
- 627 Rodesney, C.A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B.J., Katira, P., Touhami, A., et al. (2017).
628 Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the
629 cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114,
630 5906-5911. doi: 10.1073/pnas.1703255114.
- 631 Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., and Prince, A.S. (2005). Pathogen-host
632 interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171,
633 1209-1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- 634 Schuster, M., and Greenberg, E.P. (2006). A network of networks: quorum-sensing gene
635 regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296, 73-81. doi:
636 10.1016/j.ijmm.2006.01.036.
- 637 Schuster, M., and Greenberg, E.P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas*
638 *aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* 8, 287. doi:
639 10.1186/1471-2164-8-287.
- 640 Secor, P.R., Jennings, L.K., Michaels, L.A., Sweere, J.M., Singh, P.K., Parks, W.C., et al.
641 (2015). Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize
642 the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb Cell* 3, 49-52.
643 doi: 10.15698/mic2016.01.475.
- 644 Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., et al.
645 (2017a). Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the
646 Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo. *Infect Immun*
647 85(1). doi: 10.1128/IAI.00648-16.
- 648 Secor, P.R., Sass, G., Nazik, H., and Stevens, D.A. (2017b). Effect of acute predation with
649 bacteriophage on intermicrobial aggression by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 12,
650 e0179659. doi: 10.1371/journal.pone.0179659.
- 651 Shen, D.K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B., et al. (2008).
652 High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system:
653 implications for tryptophan catabolites. *Microbiology* 154, 2195-2208. doi:
654 10.1099/mic.0.2007/013680-0.
- 655 Siryaporn, A., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., and Gitai, Z. (2014). Surface attachment induces
656 *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16860-16865. doi:
657 10.1073/pnas.1415712111.
- 658 Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A.S., Backofen, R., et
659 al. (2011). The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa*
660 quinolone signal. *Mol Microbiol* 80, 868-885. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x.
- 661 Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans*
662 by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc*
663 *Natl Acad Sci U S A* 96, 715-720. doi: 10.1073/pnas.96.2.715.
- 664 Tortuel, D., Tahrioui, A., Rodrigues, S., Cambronel, M., Boukerb, A.M., Maillot, O., et al.
665 (2020). Pf4 phage infection induces the SOS and the cell envelope stress responses in
666 *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol*. (submitted).
- 667 Webb, J.S., Lau, M., and Kjelleberg, S. (2004). Bacteriophage and phenotypic variation in
668 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186, 8066-8073. doi:
669 10.1128/JB.186.23.8066-8073.2004.
- 670 Weng, L.X., Yang, Y.X., Zhang, Y.Q., and Wang, L.H. (2014). A new synthetic ligand that
671 activates QscR and blocks antibiotic-tolerant biofilm formation in *Pseudomonas*
672 *aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 2565-2572. doi: 10.1007/s00253-013-5420-
673 x.

- 674 Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., et al.
675 (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which
676 controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 52, 873-893.
677 doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x.
- 678 Williams, P., and Camara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in
679 *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal
680 molecules. *Curr Opin Microbiol* 12, 182-191. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.005.
- 681 Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., et al. (1998).
682 Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl
683 homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163, 185-192. doi:
684 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13044.x.
- 685 Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., et al. (2003).
686 Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and
687 environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,
688 8484-8489. doi: 10.1073/pnas.0832438100.
- 689 Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H.V., and Jin, S. (2004). MucA-mediated coordination
690 of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 186,
691 7575-7585. doi: 10.1128/JB.186.22.7575-7585.2004.
- 692 Yanagihara, K., Tomono, K., Kaneko, Y., Miyazaki, Y., Tsukamoto, K., Hirakata, Y., et al.
693 (2003). Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas*
694 *aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. *J Med Microbiol* 52, 531-
695 535. doi: 10.1099/jmm.0.05154-0.

696

697

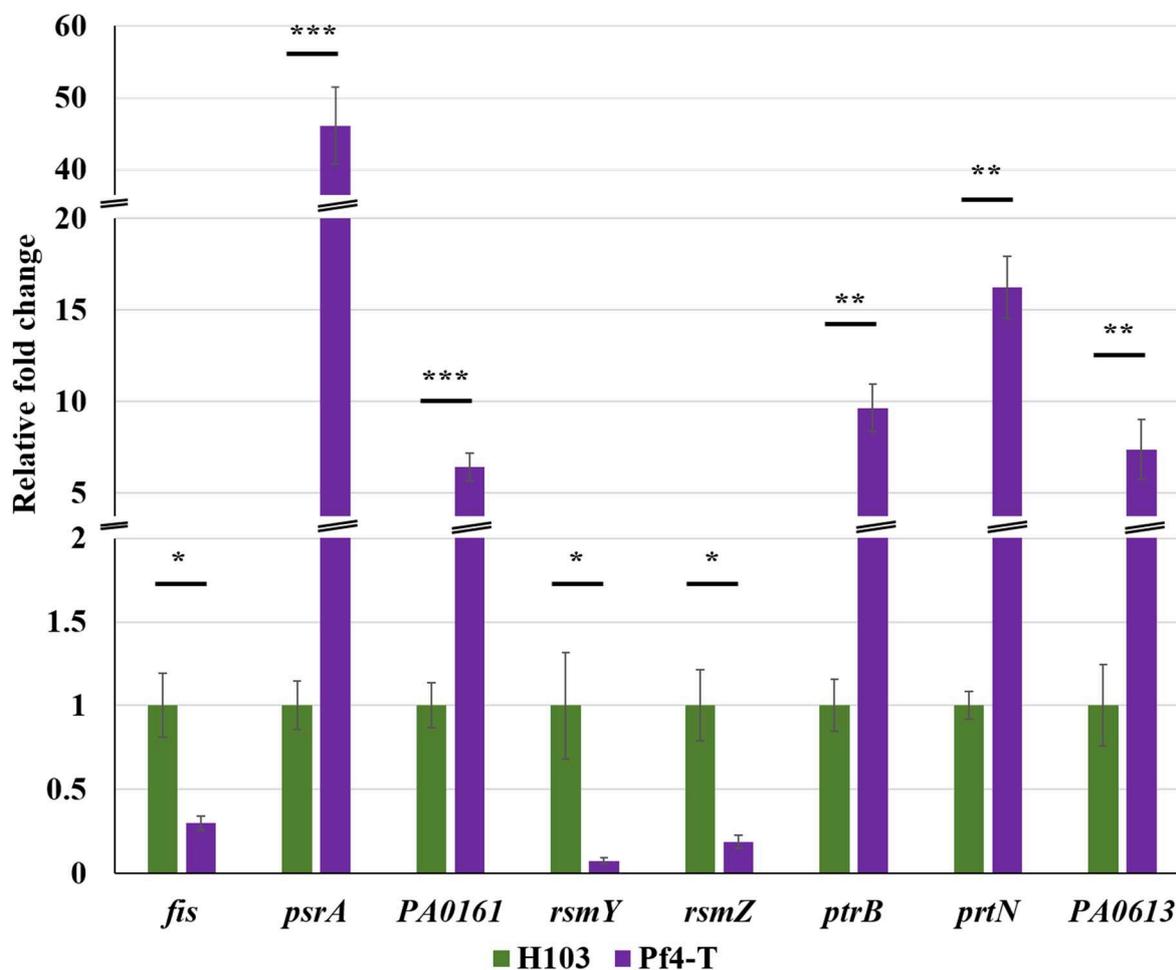


Figure 36. Résultats complémentaires en lien avec la virulence dans la condition d'infection par les phages Pf4.

Expression relative de *fis*, *psrA*, *PA0161*, *rsmY*, *rsmZ*, *ptrB*, *prtN* et *PA0613* et sur les souches dH103 et dH103Pf4⁺ mesurées par RT-qPCR. Cette expérience a été réalisée quatre fois indépendamment. Un *t*-test bilatéral non-apparié a été utilisé comme test statistique. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

b. Résultats complémentaires

En complément des résultats obtenus, nous avons voulu explorer différentes voies pouvant réguler l'expression ou la traduction d'ExsA. Ainsi, par RT-qPCR, nous avons montré que l'expression de *fis* est diminuée, et celle de *psrA* et PA0161, augmentée (**Figure 36**). Il est d'ailleurs intéressant de noter que PsrA est activé en réponse à une diminution d'AG à longues chaînes. SigX a été décrit comme stimulant la production des acides gras à courtes chaînes (**Boechat et al., 2013**). Dans nos conditions, l'activité de SigX est augmentée, entraînant une augmentation de la fluidité membranaire. Il est donc possible que PsrA soit activé dans nos conditions. RsmA est un régulateur post-transcriptionnel majeur du SST3. L'expression de *rsmY* et *rsmZ*, deux petits ARN impliqués dans la séquestration de RsmA empêchant son activité, est diminuée (**Figure 36**), laissant supposer un taux de RsmA libre plus élevé dans la cellule. Il est également connu que la voie SOS, activée dans nos conditions, puisse réguler *exsA*, via la protéolyse du répresseur PrtR, permettant l'activité de PtrB (**Wu et Jin, 2005**). Son expression est effectivement augmentée dans nos conditions (**Figure 36**). Collectivement, l'ensemble de ces données démontre que l'expression et l'activité d'ExsA sont régulées par un ensemble complexe d'acteurs interconnectés, supposant que l'activité de certains régulateurs puisse être plus important dans la régulation d'ExsA que d'autres, selon les conditions (**Figure 37**). En tout cas, l'activité d'ExsA semble être également stimulée, puisque l'expression d'*exoS* et *exoT*, deux cibles d'ExsA, est augmentée dans nos conditions. Ces résultats suggèrent une stimulation du SST3 qui n'est pas confirmée par le résultat de cytotoxicité, ce dernier étant diminué dans nos conditions (**Figure 37**). Enfin, la réponse SOS étant activée dans nos conditions, et PrtR semblant être protéolysé dans nos conditions, nous avons voulu vérifier l'expression de *prtN*, codant un régulateur des gènes impliqués dans la production des pyocines. L'expression de *prtN*, ainsi que celle du PA0613, codant le premier gène de la pyocine F2, est augmentée dans nos conditions (**Figure 36**), suggérant la production de pyocines (**Figure 37**).

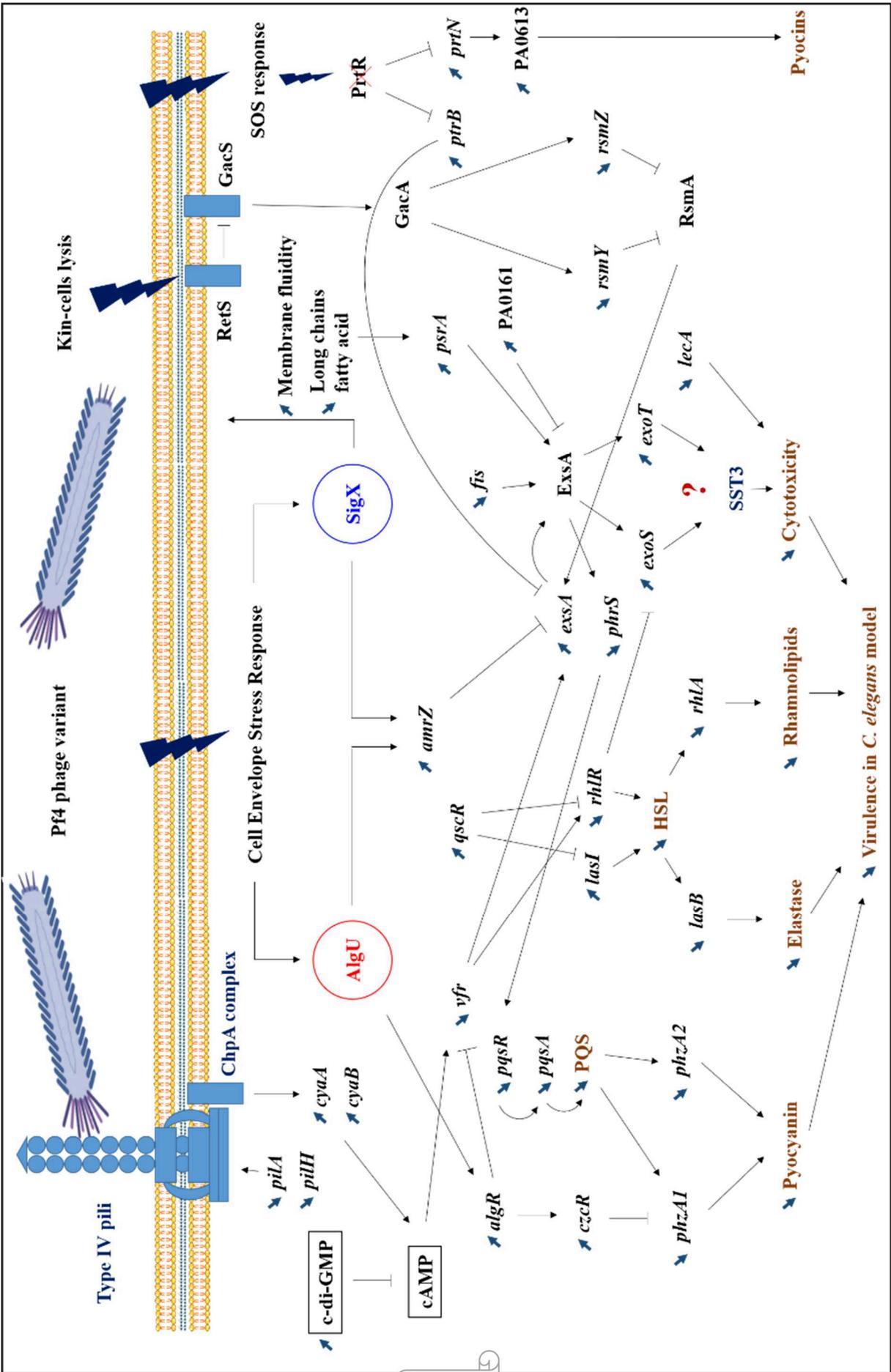


Figure 37. Schéma récapitulatif de l'impact de l'infection des phages Pf4 superinfectifs sur la virulence.

Schéma modifié de l'article, en incluant les données sur la voie Chp/Vfr, ExsA, la voie Gac, et la production des pyocines.

4. Conclusion

Ces travaux ont conduit à la construction d'un outil moléculaire qui a déjà permis l'isolement d'un mutant qui surproduit des phages Pf4 et a permis l'identification d'un nouveau stress induisant fortement la réponse au stress d'enveloppe chez *P. aeruginosa*, activant AlgU et particulièrement SigX. Cette forte augmentation de l'expression et de l'activité de SigX nous indique que ces conditions (un traitement par des phages Pf4 superinfectifs), se rapprochent du signal activant SigX. L'exploitation de cette banque conduira, à la suite du criblage des mutants restants, à l'identification de nouveaux régulateurs et conditions régulatrices de l'expression et/ou de l'activité de SigX.

II. Fonctions cellulaires et liens régulationnels entre les membres du système CmaX-CfrX-CmpX et SigX

1. Introduction

La gène *sigX* est localisé dans un environnement atypique, en amont d'*oprF*, et en aval d'un opéron de trois gènes, *cmaX*, *cfrX* et *cmpX* de fonction encore méconnue chez *P. aeruginosa*. Comme mentionné précédemment, CmaX serait un homologue de CorA d'*E. coli*, un transporteur de cations. CfrX pourrait être un facteur anti- σ putatif (Staroń et al., 2009) et CmpX un canal mécanosensible appartenant à la famille MscS. Notamment, un mutant $\Delta cmpX$ a été montré comme étant moins virulent, notamment à cause d'une dérégulation de la voie Gac/Rsm (Bhagirath et al., 2018). Si l'appartenance de *cfrX* et *cmpX* au régulon SigX (Blanka et al., 2014; Gicquel et al., 2013) et celle de *cmaX* à celui d'AlgU (Schulz et al., 2015; Wood et Ohman, 2009) a été suggéré par des études transcriptomiques, les mécanismes de régulation et les promoteurs impliqués ne sont pas encore décrits. De manière intéressante, l'expression de *sigX* est augmentée dans des conditions environnementales susceptibles d'activer également les canaux mécanosensibles, et en particulier en condition d'hypo-osmolarité (Bouffartigues et al., 2012; Brinkman et al., 1999) et de microgravité (Crabbé et al., 2011). La température, paramètre-clef affectant la fluidité des membranes, a été montré pour moduler les propriétés de mécanoperception de MscS (Koprowski et al., 2015). Dans le but de préciser les conditions d'expression de l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* et de préciser le rôle de CmpX chez *P. aeruginosa*, nous avons, d'une part, étudié l'impact de la température sur l'expression de l'opéron, et d'autre part, tenté de préciser le rôle de CmpX dans l'homéostasie de l'enveloppe en phase stationnaire de croissance.

2. La régulation par la température de l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* chez *P. aeruginosa* implique les facteurs σ AlgU et SigX, et le régulateur AmrZ.

La température est l'un des premiers signaux physiques qui permet aux bactéries de distinguer un hôte potentiel de son environnement. Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au choc thermique chaud soient relativement bien caractérisés chez *P. aeruginosa*, impliquant le facteur σ ECF AlgU, ceux impliqués dans la réponse à un choc thermique froid ne sont que peu décrits.

Le rôle récemment démontré de SigX dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans la composition protéique et lipidique des membranes chez *P. aeruginosa* suggère son implication dans la perception de la température, un paramètre environnemental bien connu pour affecter la structure et la fluidité des bicouches lipidiques. Dans ces travaux, nous avons étudié l'implication de SigX et d'AlgU dans la réponse à de brèves variations de la température en phase exponentielle de croissance. Nous montrons que l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* est différenciellement régulé par la température. En effet, l'expression de *cmaX* est sous la dépendance d'un promoteur AlgU-dépendant et est plus exprimé en réponse à un stress thermique chaud, alors que *cfrX* et *cmpX* forme une unité transcriptionnelle sous le contrôle de SigX, activé après un choc thermique froid. De manière intéressante, nous montrons également que SigX est activé en réponse à la valinomycine, un agent provoquant une rigidité membranaire importante des membranes, et impliqué dans ces conditions dans l'expression d'*amrZ*.

J'ai contribué à cet article en participant aux expériences avec la valinomycine, et au travers de la relecture du manuscrit.

The temperature-regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *cmaX-cfrX-cmpX* operon reveals an intriguing molecular network involving the sigma factors AlgU and SigX

Emeline Bouffartigues^{1,*}, Ishac Si Hadj Mohand¹, Olivier Maillot¹, Damien Tortuel¹, Jordane Omnes¹, Audrey David¹, Ali Tahrioui¹, Rachel Duchesne¹, Cecil Onyedikachi Azuama¹, Michael Nusser³, Gerald Brenner-Weiss³, Nathalie Connil¹, Alexis Bazire², Nicole Orange¹, Marc GJ Feuilloy¹, Olivier Lesouhaitier¹, Alain Dufour², Pierre Cornelis¹, Sylvie Chevalier¹

¹ Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Centre de Sécurité Sanitaire de Normandie, Evreux, France.

² Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) EA3884, IUEM, Université de Bretagne-Sud, Lorient, France.

³ Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany.

* Corresponding Author: Emeline Bouffartigues, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France.
Tel: +33-235140000; Fax: +33-232291550; emeline.bouffartigues@univ-rouen.fr

Running title: Thermo-regulation of the *cmaX-cfrX-cmpX* operon

1 **Originality –Significance statement**

2 The mesophilic opportunistic pathogen *P. aeruginosa* is able to detect many different environmental
3 cues and to quickly adapt its behaviour to the conditions encountered. Because temperature is one of
4 the first physical signal that allows bacteria to distinguish a potential host from its environment, the
5 response of *P. aeruginosa* has been more investigated in case of elevated rather than low growth
6 temperature. Here, we show that the extracytoplasmic function sigma (ECF_{σ}) factor SigX is a crucial
7 effector in the latter condition, as well as the two members of an intriguing operon encoding the
8 uncharacterized mechanosensitive ion channel CmpX and the hypothetical protein CfrX, while the
9 AlgU-dependent CmaX could contribute to the heat shock response. In addition, we show that SigX is
10 activated following membrane structure alterations revealing its potential involvement in the molecular
11 mechanisms of mechanosensing that could be related to CmpX. More generally, we have identified the
12 temperature as a key environmental factor regulating antagonistically the expression and the activity of
13 the two major cell wall stress response ECF_{σ} factors in *P. aeruginosa*, suggesting that they are involved
14 in specific but interconnected network in which AmrZ could play a role by a mechanism that remains to
15 explore.

16

17 **Summary (194 words)**

18 *Pseudomonas aeruginosa* is a highly adaptable opportunistic pathogen, notably due to its large number
19 of transcription regulators. The extracytoplasmic sigma factor (ECF σ) AlgU is responsible for alginate
20 biosynthesis, involved in responses to cell wall stress and heat shock via the RpoH alternative σ factor.
21 The SigX ECF σ emerged as a major regulator involved in the envelope stress response via membrane
22 remodelling and in virulence and biofilm formation. However, their functional interactions to coordinate
23 the envelope homeostasis in response to environmental variations remain to be specified. The
24 regulation of the putative *cmaX-cfrX-cmpX* operon located directly upstream *sigX* was investigated by
25 applying sudden temperature shifts from 37°C. We identified a SigX-dependent promoter region
26 upstream of *cfrX*, in addition to an AlgU-dependent one lying upstream of *cmaX*. We show that *cmaX*
27 expression is increased upon heat shock through an AlgU-dependent but RpoH independent
28 mechanism. In addition, the ECF σ SigX, which is activated in response to valinomycin an agent altering
29 the membrane structure, up-regulates *cfrX-cmpX* transcription in response to cold shock. Altogether,
30 these data provide new insights into the regulation exerted by SigX and networks that are involved in
31 maintaining envelope homeostasis.

32 **Introduction**

33 Temperature shift is a ubiquitous signal perceived by living organisms to adapt their behaviours. The
34 heat shock (HS) and cold shock (CS) responses (R), involve heat shock proteins (Hsps) and cold
35 inducible proteins (Cips), respectively. Importantly, HS and CS responses are also activated in
36 response to antibiotics in bacteria (VanBogelen and Neidhardt, 1990; Kindrachuk *et al.*, 2011),
37 highlighting their importance in antibiotic resistance, noticeably of ESKAPE pathogens (*Enterococcus*
38 *faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*
39 *aeruginosa*, and *Enterobacter* species)(Esposito and De Simone, 2017). *P. aeruginosa* is a highly
40 adaptable Gram-negative bacterium that can colonize a variety of ecological niches (Spiers *et al.*, 2000)
41 and infect various hosts (Baldini *et al.*, 2014; Rahme *et al.*, 2000). Being intrinsically resistant to a wide
42 range of antibiotics and disinfectants, *P. aeruginosa* is responsible of both acute and chronic
43 community- and hospital-acquired infections (Lyczak *et al.*, 2002). Its remarkable versatility is
44 associated with the over-representation of genes encoding sensors, signal transduction systems and
45 regulators such as sigma factors (Stover *et al.*, 2000; Chevalier *et al.*, 2018).

46 A sudden temperature rise above 45°C activates the RpoH (σ^{32})-dependent HS response in *P.*
47 *aeruginosa* (Allan *et al.*, 1988) that, together with the extracytoplasmic sigma factor (ECF σ) AlgU, co-
48 regulates the production of the alginate exopolysaccharide via over-expression of the *algD* operon
49 leading to a mucoid phenotype (Schurr and Deretic, 1997). AlgU is a homologue of the *Escherichia coli*
50 RpoE cell wall stress response ECF σ , whose expression is auto-regulated at the transcriptional level,
51 and its activity modulated at the post-translational level by a conserved mechanism of regulated-
52 intramembrane proteolysis (Chevalier *et al.*, 2018). The AlgU regulon includes *rpoH* encoding the heat
53 shock RpoH sigma factor (Schurr *et al.*, 1995), *amrZ* (AlgU-dependent alginate and motility regulator)
54 encoding a transcriptional regulator involved in *algD* expression (Tart *et al.*, 2006), *oprF* coding for the
55 major and multi-functional outer membrane porin (Chevalier *et al.*, 2017), together with numerous genes
56 involved in bacterial adaptation and cell wall synthesis (Wood and Ohman, 2009; Schulz *et al.*, 2015).
57 In agreement with its role in envelope homeostasis, AlgU is more expressed in response to
58 hyperosmolarity (Aspedon *et al.*, 2006), inhibition of cell wall synthesis (Wood and Ohman, 2009),
59 exposure to microgravity stress (Crabbé *et al.*, 2010), the absence of the Hfq RNA chaperone

60 (Sonnleitner *et al.*, 2006) and OprF (Bouffartigues *et al.*, 2015). Except for hyperosmolarity, the same
61 conditions also increase the expression of *sigX*, another envelope stress ECF σ whose regulatory
62 mechanisms and stimulus are unknown. SigX is up-regulated in LB containing high sucrose
63 concentration (Bouffartigues *et al.*, 2014) and by hypo-osmolarity (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues
64 *et al.*, 2012), two conditions affecting membrane homeostasis. Initially, SigX was known to be involved
65 in *oprF* transcription together with AlgU. However, the characterization of the transcriptome and
66 proteome of *sigX* mutant and *sigX* overexpressing strains suggested its involvement in the expression
67 of fatty acids biosynthetic genes (Gicquel *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014; Flécharde *et al.*, 2018).
68 Although a SigX-overexpressing strain is more resistant to a 2h CS at 15°C (Boechat *et al.*, 2013),
69 highlighting its role in membrane fluidity, its expression in response to temperature variations has not
70 been investigated.

71 In addition to OprF (Jaouen *et al.*, 2004), the products of at least two genes belonging to the *sigX*
72 genomic locus, *cmaX* and *cmpX*, could be involved in temperature adaptation. Indeed, CmaX is
73 homologous to the CorA Mg²⁺-dependent channel. Interestingly, the increase of these transport proteins
74 enhanced the survival of *Salmonella enterica* at high temperature (O'Connor *et al.*, 2009), a condition
75 that increased transcription of both *corA* in *E. coli* (Richmond *et al.*, 1999) and *cmaX* in *P. aeruginosa*
76 (Chan *et al.*, 2016). CmpX is a predicted MscS small mechanosensitive ion channel. These membrane
77 tensions-gated pores are involved in osmotic downshift adaptation (Martinac *et al.*, 2014). Inversely to
78 *corA*, the expression of *mcsS* in *E. coli*, increased in response to low temperature (White-Ziegler *et al.*,
79 2008). In addition, the MscS mechanosensitive properties are affected by the temperature (Koprowski
80 *et al.*, 2015), suggesting that these proteins could be membrane fluidity sensors. *cmaX* and *cmpX* are
81 predicted to form an operon together with *cfrX* (Database for prokaryotic OpeRons DOOR) (Mao *et al.*,
82 2009). Altogether, these observations suggest that this putative operon might be differentially regulated
83 by temperature.

84 Here, we studied the impact of temperature shifts on the *cmaX-cfrX-cmpX* operon expression and
85 investigated the involvement of the sigma factors AlgU, RpoH and SigX in its regulation. We showed
86 that this operon expression is induced under HS from a *cmaX*-proximal promoter region regulated by
87 AlgU. We showed that CS is a new condition affecting *sigX* expression. In connection with this
88 observation we also demonstrated that the level of *sigX* mRNA was increased following an exposure to
89 valinomycin, a membrane modification promoting agent, suggesting that SigX responds to membrane

90 alteration. Interestingly, we observed that SigX and AmrZ could be involved in the positive feedback
91 regulation loop that was highlighted in response to CS. Finally, our data suggest a fine-tuned
92 interconnection between the two cell wall stress response SigX and AlgU ECF σ that could be relevant
93 in others stress conditions affecting the membrane fluidity and structure.

94 **Results**

95 **Members of the *cmaX-cfrX-cmpX* operon are differentially regulated in response to HS or CS.**

96 The bacterial cells viability was evaluated by flow cytometry after a double labelling with SYTO 9 (alive
97 cells) and propidium iodide (dead cells) (Supplementary Fig. S1). Compared to the control condition at
98 37°C, a downshift at 4°C during 15 or 30 min had no significant effect on H103 wild-type (WT, (Hancock
99 and Carey, 1979)) viability while an upshift at 60°C increased the percentage of dead cells from 0.6 to
100 1.9% after 15 min and from 0.3 to 2.4% after 30 min of exposure. Noticeably, the bacterial population
101 submitted to a 30 min HS was more heterogeneous compared to 15 min exposure, with 18.1% and
102 11.8% of injured cells, respectively. Therefore, the following sublethal conditions (HS: 15 min at 60°C;
103 CS: 30 min at 4°C) were applied in the subsequent experiments. The impact of these temperature shifts
104 on the expression of the predicted *cmaX-cfrX-cmpX* operon was evaluated using RT-qPCR. Following
105 a HS, *cmaX*, *cfrX*, and *cmpX* mRNA levels were increased (Fig. 1A, Supplementary Table 1).
106 Conversely, only *cfrX* and *cmpX* were significantly up-regulated under CS (Fig. 1B, Supplementary
107 Table 1). These results suggest that *cfrX-cmpX* could be thermo-regulated at the transcriptional level
108 from a promoter lying upstream of *cfrX*.

109 **Identification of a promoter region upstream of *cfrX-cmpX*.**

110 The 500 nucleotides DNA sequences upstream of each gene were analysed using Bprom (Softberry).
111 Two σ 70-like consensus promoters were found (Fig. 2A, B), TTGACT(-35)-N17-TTTACT(-10) located
112 in the intergenic region between *rraA* (PA1772) and *cmaX*, and ATGAAC(-35)-N17-
113 TGGTATAAT(extended -10), within the *cmaX* encoding sequence, upstream of *cfrX*. No σ 70-like
114 promoter was predicted within the 500 nucleotides upstream of *cmpX*. The transcriptional start sites
115 (TSS) of *cmaX* and *cfrX* were then identified at positions -26 for *cmaX* and -208 for *cfrX* relatively to the
116 translational initiation site, downstream of the corresponding predictive -35 and -10 boxes (Fig. 2B, C).
117 The activity of each promoter region was measured during *P. aeruginosa* H103 growth in LB medium

118 at 37°C using two bioluminescent reporters, pAB*cmaX* and pAB*cfrX* (Fig. 2D, E). The relative
119 luminescence (RL) signal from pAB*cmaX* decreased at the beginning of the mid-log phase before
120 increasing and finally reaching its maximum level of 0.27 RLU/sec*A₅₈₀ × 10⁶ before decreasing at the
121 end of the log phase. The pAB*cfrX* promoter region was much more active, reaching a maximal level
122 of 9.8 RLU/sec*A₅₈₀ × 10⁶. The RL increased rapidly at the beginning, decreased slowly during the log
123 phase and more steeply during the stationary phase. Confirming our sequence analysis, no
124 transcriptional activity was detected from a transcriptional fusion harbouring a 224-bp DNA fragment
125 upstream of *cmpX* (data not shown). Our data confirmed the existence of a promoter region, which
126 could differentially regulate the expression of *cfrX* and *cmpX* compared to that of the full length *cmaX*-
127 *cfrX-cmpX* operon in different environmental conditions.

128 **AlgU but not RpoH is involved in the regulation of *cmaX-cfrX-cmpX*.**

129 The expression of *algU* and its known targets *algD*, *rpoH*, *oprF* and *amrZ* was quantified using RT-
130 qPCR. The *algU* mRNA level was increased when bacteria were under HS (Supplementary Fig. S2 and
131 Supplementary Table 1). Accordingly, the mRNA levels of *algD*, *rpoH* and *oprF* were significantly
132 increased, while the expression of *amrZ* was reduced. The expression of the same genes was not
133 significantly changed in response to a CS (Supplementary Fig. S2 and Supplementary Table 1),
134 confirming the involvement of *P. aeruginosa* H103 AlgU in the HS, but not in the CS response. By visual
135 inspection, a putative AlgU recognition motif was detected (GAATT(-35)-N15-TGTGT(-10)) upstream
136 of *cmaX* (Fig. 2B), which is highly similar to the known AlgU consensus binding sequence (GAACTT-
137 N16/17-TCTNN) (Firoved *et al.*, 2002). To confirm the involvement of AlgU in this promoter region
138 activity, the pAB*cmaX* plasmid was introduced in an isogenic *algU* mutant and the bioluminescence
139 signal was measured during growth in LB medium at 37°C (Fig. 3A). The RL signal reached a maximum
140 level of 0.21 RLU/sec*A₅₈₀ × 10⁶ at the beginning of the mid-log phase, corresponding to an increase of
141 about 50% compared to the WT, followed by a 50% decrease during exponential growth, suggesting
142 an AlgU involvement in the control of this promoter region at this growth step. The involvement of AlgU
143 in the HS-inducible expression of the previously selected AlgU-regulated genes and of the *cmaX-cfrX*-
144 *cmpX* operon was examined using RT-qPCR. Relatively to the expression measured in a WT strain
145 similar expression levels were observed in the *algU* mutant grown at 37°C for all the genes tested,
146 suggesting that AlgU only slightly contributes to their transcription in our control condition (Fig. 3B,

147 Supplementary Table 1). Although a residual heat-inducible expression of *algD* of about 30% was
148 observed in the *algU* mutant, the *rpoH* and *oprF* expressions were unchanged when the *algU* mutant
149 strain was exposed to HS, confirming that AlgU was required for their increased transcription in
150 response to HS (Fig. 3B, Supplementary Table 1). Interestingly, as observed for H103, the *amrZ*
151 expression was down-regulated in the HS exposed *algU* mutant, suggesting an AlgU-independent
152 mechanism of *amrZ* repression under HS. Similar to AlgU-targets *rpoH* and *oprF*, the heat-inducible
153 expression of *cmaX-cfrX-cmpX* measured in H103 under HS was not observed in an *algU* mutant,
154 indicating an AlgU involvement in the HS-induced increased expression of the operon (Fig. 3B,
155 Supplementary Table 1). To evaluate the involvement of RpoH in the Heat-inducible expression of *the*
156 *operon* a *rpoH* mutant in PAO1 was used. As previously observed in H103, the expression of *cmaX*
157 was increased and in a lesser extent those of *cfrX* and *cmpX* in PAO1 exposed to our Heat shock
158 condition (Supplementary Figure S3, Supplementary Table 1). A similar effect was observed in a RpoH
159 mutant, suggesting that RpoH is not involved in the regulation of the operon in PAO1.

160 **SigX contributes to *P. aeruginosa* CS response**

161 Total proteins from H103 cells harvested during mid-log phase and exposed or not to CS during 30 min
162 were extracted and separated by two-dimensional gel electrophoresis (2D-E). Nine protein spots
163 showing reproducible different intensities were identified by mass spectroscopy, among which some
164 correspond to well-known markers of the CS response in other bacterial species (Beran and Simons,
165 2001; Gao *et al.*, 2006) (Table 1, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table 2): two translation
166 elongation factors (EF-Tu and Ef-Ts) and a well-described cold-inducible RNase (PNP), which were up-
167 regulated, and could together contribute to facilitate gene expression at the post-transcriptional level.
168 Five of the identified proteins are involved in the general metabolism and energy production. The
169 arginine deiminase (ArcA), of the arginine fermentation pathway was down-regulated, while the 3-
170 phosphoglycerate kinase (Pgk), the 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase (Hpd), the electron transfer
171 flavoproteins EtfA and EtfD were more abundant under CS, respectively (Table 1). Pgk, Hpd, and the
172 Etf pathway contribute to an oxidative energy production through their involvement in glycolysis, the
173 phenylalanine/tyrosine catabolism and the utilization of branched-chain amino acids and fatty acids,
174 respectively. In agreement with membrane lipid composition remodelling in response to CS, the
175 abundance of the acetyl-coenzyme carboxylase A (AccA) was higher under CS (Figure 4, Table 1).

176 This protein is a subunit of the ACC complex and acts in concert with AccB, AccC and AccD to provide
177 the metabolic intermediate malonyl-coA for *de novo* biosynthesis of fatty acids, which could contribute
178 to restore the membrane fluidity upon a temperature downshift. Interestingly, the long chain fatty acid
179 sensory regulator PsrA which negatively regulates the genes encoding the Etf pathway (Kojic *et al.*,
180 2005; Kazakov *et al.*, 2009) and *acc* genes, were previously shown to belong to the SigX regulon
181 (Boechat *et al.*, 2013; Gicquel *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014), suggesting that this ECF σ is able to
182 respond to a sudden temperature downshift. The mRNA levels of *accA* and *accB* under CS condition
183 were compared to those at 37°C in the WT strain (Fig. 4A). In line with the increased abundance of
184 AccA, *accA* and *accB* expression was increased. Interestingly, the self-regulated *psrA* gene was down-
185 regulated indicating possibly a transcriptional de-repression of the Etf pathway (Figure 4). The observed
186 positive effect of the temperature downshift on *accA* and *accB* mRNA abundances could result from the
187 accumulation of SigX since its gene expression was up-regulated as well (Fig. 4A). Consistently, CS
188 caused an increase of the mRNA level of PA5174, a presumed direct SigX-target encoding the
189 predominant FabY enzyme catalysing the condensation of acetyl coenzyme A with malonyl-ACP (Yuan
190 *et al.*, 2012).

191 **Valinomycin increases *sigX* expression**

192 To evaluate whether induced stiffening of the membrane could represent a stimulus increasing *sigX*
193 expression, its mRNA level was measured after treatments of cells with sublethal concentrations of
194 valinomycin, an antibacterial agent affecting the membrane. Alterations of membrane fluidity were
195 evaluated by fluorescence anisotropy at the aqueous interface (1-[4-(trimethylamino)phenyl]-6-phenyl-
196 1,3,5-hexatriene (TMA-DPH)) and at the hydrophobic core (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)) of the
197 membrane. As previously reported (El Khoury *et al.*, 2017) a significant increase of the anisotropy of
198 both TMA-DPH and DPH probes was observed for valinomycin-exposed cells, confirming that
199 valinomycin promotes membrane stiffening (Fig. 4B and Supplementary Fig. S5). Shorter exposition
200 times were used to follow the early response of *sigX* to membrane perturbation (Fig. 4C). After 2h
201 promoting the incorporation of valinomycin into the lipid bilayer, an increase of fluorescence anisotropy
202 was observed with both membrane probes, showing that the membranes were more ordered and
203 compact in this culture condition (Fig. 4B) while a strong increase of *sigX* mRNA level was measured

204 (Fig. 4C). Taken together, this set of data shows that *sigX* responds to membrane stressors which
205 cause membrane stiffening.

206 **SigX is involved in the expression of *cfrX-cmpX* and *amrZ* under CS**

207 When comparing the relative bioluminescence signals measured from H103 or $\Delta sigX$ (PAOSX)
208 harbouring pAB*cfrX*, only a residual background activity of about 8% was observed for $\Delta sigX$ during the
209 log phase, revealing a major contribution of SigX to *cfrX* promoter activity (Fig. 5A). The expression of
210 the set of previously identified SigX targets was further evaluated in PAOSX at 37°C and under CS by
211 RT-qPCR. Except for *psrA*, the expression of *sigX* as well as of the other SigX-regulated genes, *accA*,
212 *accB* and PA5174 (*fabY*), was significantly down-regulated in $\Delta sigX$ compared to H103 (Fig. 5B,
213 Supplementary Table 1). Confirming that *cfrX* and *cmpX* are under the control of SigX in our control
214 condition at 37°C, their expression was likewise downregulated. Under CS, the mRNA levels of these
215 genes, including *cfrX* and *cmpX*, were not significantly increased in $\Delta sigX$ (Fig. 5B, Supplementary
216 Table 1), confirming that their cold-inducible expression was SigX-dependent. The *psrA* mRNA level
217 was lower in $\Delta sigX$ than in H103 when cells were exposed to a sudden temperature downshift (Fig. 5B,
218 Supplementary Table 1). This result might indicate that, while the repression of *psrA* in response to CS
219 is likely related to a SigX-independent mechanism, this ECF σ could further contribute to *psrA*
220 transcription under temperature stress. Taken together, these data support that the *cfrX-cmpX*
221 transcriptional unit is under the direct control of SigX, which is responsible for the increase of its
222 transcription in response to CS. We next focused on AmrZ, whose expression was co-regulated with
223 *sigX* during HS (Fig. 3B), and which was shown by RNA-seq analysis to positively control *cfrX* and
224 *cmpX*, as well as the CS-inducible SigX-target genes *accA* and PA5174 (*fabY*) (Jones *et al.*, 2014).
225 Consistently, AmrZ binding was identified upstream of *sigX* by ChIP-Seq in *P. fluorescens* F113
226 genome (Martínez-Granero *et al.*, 2014). Altogether this set of data suggests that SigX and AmrZ could
227 be involved in a feedback loop depending on the environmental condition. To evaluate the contribution
228 of SigX in *amrZ* transcription in response to CS, the *amrZ* mRNA level was measured in the WT and
229 $\Delta sigX$ strains exposed or not to CS. In H103, the *amrZ* expression was not upregulated in response to
230 CS (Fig. 5C). However, it was about three times down-regulated in PAOSX exposed to CS compared

231 to untreated and CS treated H103, indicating that SigX could be involved in *amrZ* transcription in
232 response to CS.

233 **Discussion**

234 Sudden temperature variations can trigger a cell wall stress response (CWSR) by altering the
235 membrane composition, structure and functionality. Although the molecular mechanisms involved in the
236 HS response are relatively well characterized in *P. aeruginosa*, involving the AlgU ECF σ via its regulon
237 member RpoH, those involved in the CS response have only been scarcely described. Therefore,
238 characterizing these mechanisms should highlight new effectors playing a key role in envelope
239 homeostasis and in the adaptive capacity of *P. aeruginosa* under other chemical and physical stresses.
240 In the present study, we focused on the description of the uncharacterized *cmaX-cfrX-cmpX* operon
241 regulatory mechanisms by a combination of approaches, including bioinformatics, transcriptomics,
242 proteomics and fluorescence polarization assays. Based on the identification of two promoter regions
243 located upstream of *cmaX* and *cfrX-cmpX*, we demonstrated that AlgU and SigX differentially regulate
244 the members of this cluster in function of temperature variations, and we therefore postulate that these
245 two CWSR ECF σ respond to specific stimuli that can be caused by opposite temperature variations
246 from 37°C (Fig. 6). In agreement with previous results obtained by genome-wide transcription start site
247 (TSS) mapped by RNA-seq (Wurtzel *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2015), we confirmed using RACE-PCR
248 that the *cmaX-cfrX-cmpX* transcription can be initiated from at least one promoter localized 26
249 nucleotides upstream of the *cmaX* translation initiation codon. Altogether, our results support *cmaX* as
250 a member of AlgU regulon, but also highlight the existence of additional molecular mechanisms that
251 could be involved in the cluster regulation, since a weaker increase of *cfrX* and *cmpX* mRNA levels was
252 also measured under HS. This effect is in line with the previous transcriptomic studies aiming at
253 characterizing *P. aeruginosa* AlgU regulon after a treatment with the D-cycloserine peptidoglycan
254 synthesis inhibitor (Wood and Ohman, 2015), or the response to elevated temperature at 45°C (Chan
255 *et al.*, 2016). If a HS induction of *cmaX* was measured, neither *cfrX* nor *cmpX* were up-regulated,
256 although these three genes have been previously shown to be co-transcribed by RT-PCR (Brinkman *et*
257 *al.*, 1999). We also showed that under HS the expression profile of the operon is not altered in a *rpoH*
258 genetic background compared to the one obtained in the WT PAO1 strain, showing that RpoH is not

259 involved in the HS-inducible expression of *cmaX* and conforting the putative AlgU promoter sequence
260 identified upstream the gene. In addition, RpoH does not seem to be involved in the regulation of *cfrX*
261 and *cmpX* as well as *sigX* and *oprF* in our condition in PAO1. However, RNA-seq analyses which aimed
262 to characterize the RpoH regulon in *P. aeruginosa* PA14, showed a decrease in the expression of *cfrX*-
263 *cmpX*, *oprF* and *sigX*, which could be auto-regulated (Gicquel *et al.*, 2013), as well as an increase of
264 *cmaX* in a *rpoH* overexpressing strain (Schulz *et al.*, 2015), suggesting a potential role RpoH in the
265 regulation of the operon depending of the *P. aeruginosa* strain and /or the condition used. By regulating
266 the expression of many proteases and RNA chaperones such as Hfq that promotes RNA-RNA
267 interactions (Schulz *et al.*, 2015), RpoH could play a key role in the regulation of RNA metabolism by
268 modulating the abundance of many proteins under stress conditions. For this reason, it could be
269 interesting to better understand its role. In addition to the study of Boechat *et al.* (Boechat *et al.*, 2013)
270 who observed an instability of SigX in a *sigX* overexpression strain, the recent development of the GRIL-
271 seq tool to identify the targets of small RNAs (Han *et al.*, 2016) shows that the mRNAs of *cmpX*, but
272 also of *oprF*, *mucA* encoding the AlgU anti-sigma factor, and *amrZ* are all targets of the sRNA PrrF1 *in*
273 *vivo* (Han *et al.*, 2016). Using RNA-seq, *cfrX*, *cmpX*, *sigX*, *oprF* and *amrZ* mRNAs were also been
274 shown more abundant in a *prrF1* mutant than in a *prrF1* overexpressing strain, suggesting that the iron-
275 responsive small RNA PrrF1 may negatively control their expression. This putative but intriguing
276 regulatory mechanism, could explain the low but reproducible decrease observed in our study of *sigX*
277 and *amrZ* mRNA levels in *P. aeruginosa* H103 strain exposed to HS. We propose that the interplay
278 between the two major ECF σ controlling the envelope stress response could involve small regulatory
279 RNAs and/or proteases. In line with this hypothesis, the expression of *sigX* was shown to be repressed
280 in *P. putida* KT2440 exposed to elevated pressure, another condition that positively regulates HS and
281 negatively the expression of CS proteins (Follonier *et al.*, 2013).

282 Another major finding of this study is the increased *sigX* expression following an alteration of the
283 membrane properties or CS. In addition, these results are in agreement with a recent publication, which
284 shows that CspA1 contributes to SigX expression (Huang *et al.*, 2020). This result reinforces also the
285 hypothesis of a fairly atypical dependent regulatory mechanism of requiring further characterization.
286 Using bioinformatics, one of the main candidates suspected to be involved in SigX activity regulation is
287 CfrX (Staroń *et al.*, 2009). In agreement with previous transcriptomic data (Gicquel *et al.*, 2013; Blanka

288 *et al.*, 2014), we here confirmed that *cfrX* and *cmpX* are two SigX targets. More precisely, we show that
289 their expression is controlled by a large SigX-dependent promoter region, in which the transcription of
290 the operon can be initiated from a promoter located at -208 nucleotides from the *cfrX* translation start
291 site. Remarkably, this promoter region has a more complex activity pattern than that of *cmaX* in the WT,
292 suggesting the existence of several promoters, possibly under the control of different regulators.
293 Interestingly, a 5'UTR of 13 nucleotides has also been identified by TSS mapping RNA-seq (Schulz *et*
294 *al.*, 2015), suggesting the existence of at least one additional proximal promoter, whose activity remains
295 however to be experimentally validated. No specific TSS for *cmpX* was identified by this technique
296 (Schulz *et al.*, 2015), in agreement with our own unsuccessful attempts, confirming that *cfrX* and *cmpX*
297 are co-transcribed (Brinkman *et al.*, 1999). In view of the mechanisms known to regulate the activity of
298 ECF σ , the role of SigX in the regulation of a large promoter region upstream of the *cfrX-cmpX*
299 transcriptional unit supports the hypothesis of the involvement of CfrX but also the mechanosensitive
300 ion channel CmpX, in the regulation of SigX activity. In connection with CmpX putative activity as a
301 membrane tension sensor, and the influence of temperature on membrane structure, we chemically
302 altered the membrane fluidity using valinomycin to follow *sigX* response. Exposure to this compound
303 led to an increased membrane stiffness after a relatively short time treatment, validating the chosen
304 experimental strategy. Valinomycin was shown to directly induce alterations in the turnover of
305 phospholipid fatty acids and membrane potential in human erythrocytes with respect to its ion channel
306 function (Dise and Goodman, 1985). Following the valinomycin treatment, the *sigX* mRNA relative
307 abundance increased. Similar results were previously observed when *P. aeruginosa* was grown in
308 presence of high sucrose concentration (Bouffartigues *et al.*, 2014), a treatment stabilizing the
309 membrane composition during dehydration (Leslie *et al.*, 1995). Although the molecular mechanism
310 remains to be determined, our data strongly suggest that the membrane stiffness would trigger a
311 bacterial response via SigX. Paradoxically, expression of *sigX* was also increased in response to hypo-
312 osmolarity (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues *et al.*, 2012), a condition known for its tendency to
313 increase membrane fluidity (Los and Murata, 2004). However, these effects have not yet been
314 confirmed in *P. aeruginosa* and it would be interesting to evaluate them in shock conditions. In view of
315 currently available data on *sigX* expression regulation (Chevalier *et al.*, 2018) and the known effects of
316 CS on bacteria (Barria *et al.*, 2013), other mechanisms could be connected with our observations.

317 Finally, our results confirm the involvement of SigX in controlling membrane fluidity since a sigX mutant
318 displays a more rigid membrane, leading to impaired carbon metabolism (Fléhard et al., 2018).

319 As depicted on the scheme presented (Figure 6), the highly thermo-regulated processes described in
320 this study highlight an interconnection between the two ECF σ AlgU and SigX to coordinate the CWSR
321 in *P. aeruginosa*, in which the function of the members of the *cmaX-cfrX-cmpX* operon will now have to
322 be clarified, with regards to SigX regulation as well as envelope homeostasis. Moreover, we postulate
323 that the expression and / or the activity of these two ECF σ could be coordinated by mechanisms that
324 remain to be identified.

325 **Experimental Procedures**

326 **Bacterial strains, media and growth conditions.** The bacterial strains used in this study are listed in
327 the Supplementary Table 3. Liquid cultures were inoculated in LB medium (171mM NaCl) at an initial
328 absorbance at 580nm (A_{580}) of 0.08. Bacteria were grown at 37°C with orbital shaking at 180 rpm. Two
329 solid media were used, LB containing 1.5% (w/v) technical agar (AES CHEMUNEX) and Pseudomonas
330 Isolation Agar (PIA, Gibco-BRL, Grand Island, NY) for the selection of *Pseudomonas* strains. For CS
331 or HS experiments, cells were grown as described above until the absorbance at 580nm was between
332 0.5-0.6 and incubated at 4°C into iced water or at 60°C in stove for the indicated time. Control
333 experiments were done by incubating cultures at 37°C in the same conditions. When necessary, the
334 following antibiotics were added at the indicated concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$): gentamicin (Gm), 50;
335 tetracycline (Tc), 250; carbenicillin (Cb), 300 for *Pseudomonas* strains, and Gm, 15; Tc, 15; ampicillin
336 (Ap), 100 for *E. coli* strains.

337 **Bacterial cell viability assays by flow cytometry.** To determine the viability of cells exposed at 37°C,
4°C, or 60°C, the LIVE/

344 with 22mW blue laser at 488 and with emission wavelength at 525 nm (green, with band pass filter of
345 40 nm), while the PI stained cells were detected by 690 nm (red, with band pass filter of 50 nm).

346 **Genes expression analysis by real time quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted from
347 bacterial cultures by the hot acid-phenol method as previously described (Bouffartigues *et al.*, 2012)
348 and tested by PCR for the absence of contaminating DNA using the primers pair FcfrX/RcfrX
349 (Supplementary Table 4). The RNA concentration, the protein and solvent contaminations were
350 determined by measuring the absorbance at 260, 280 and 230 nm, respectively. Total RNA quality was
351 checked on a 2% agarose gel / 1X-TAE electrophoresis buffer prior to use for cDNA synthesis. The
352 mRNAs of interest were quantified by real-time PCR amplification of their cDNAs. Each primers pair
353 was validated by verifying that the PCR efficiency was above 0.90, and that a single PCR product with
354 the expected T_m was obtained. PCR were performed on cDNAs at least in triplicate and carried out in
SYB

371 vector according to the manufacturer's instructions (Promega) and 5 clones were sequenced to identify the 5' end of the

399 (DPH, Sigma Aldrich) or its derivative N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-
400 yl)phenylammonium p-toluenesulfonate (TMA-DPH) as previously described (Baysse *et al.*, 2005).

401 **Proteomic analysis.** Impact of a CS on the proteome of *P. aeruginosa* H103 was performed by 2D-
402 electrophoresis as previously described by Massier *et al.* (Massier *et al.*, 2012) with minor modifications.
403 Briefly, total proteins were extracted from cells, exposed or not to a CS during 30 min, as follow: bacteria
404 were harvested from 10 mL of three independent control or CS-treated cultures by centrifugation (7500g
405 for 20 min at 4°C) and suspended in 5 mL of lysis buffer (30 mM Tris-Cl pH8 and 0.1 mM
406 phenylmethanesulfonyl fluoride) prior to sonication. 350 µg of proteins were solubilized in 325 µL of re-
407 hydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-
408 propanesulfonate, Bio-Rad Laboratories), 65 mM DTT, 0.5% carrier ampholytes mixture pH3-10 (Bio-
409 Rad Laboratories) prior to loading on ReadyStrip™ IPG strip (17 cm, pH 4-7, Bio-Rad Laboratories).
410 After a passive rehydration step during 16h, isoelectric focusing parameters were set as 50 µA / strip
411 at 20°C and carried out using the following conditions: 0-100 V linear ramp for 45 min, 100-250 V rapid
412 ramp for 15 min, 250-10000 V gradual ramp for 2 h 45 and hold at 10000 V until a total of 52000 V x h
413 was reached. The proteins were separated by SDS-PAGE 10% and coomassie blue stained. Two gels
414 per protein sample were performed and scanned using a GS-800 densitometer (Bio-Rad Laboratories)
415 to allow normalization and quantification of reproducible spots detected with PDQuest 2-DE analysis
416 7.4.0 software (Bio-Rad Laboratories). Protein spots were excised from gels and characterized through
417 matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis.
418 Search parameters and statistical analyses of the sequences for proteins identification were determined
419 by the probability-based Mowse score offered by MASCOT software as described previously (Barbey
420 *et al.*, 2012).

421 **Statistics and reproducibility.** All experiments were carried out at least three times independently.
422 For RT-qPCR experiment P values were calculated with the two-tailed t-test using qstats a
423 complementary function of the Microsoft-excel based softwares previously mentioned (Muller *et al.*,
424 2002) (Fig. 1, 3B and C, 4A and C, Fig. 5B and C, Supplementary Fig. S2). Live/dead experiments, 2D-
425 E and reporter-based assays were repeated three times with similar results as specify by the indicated
426 standard deviation (Fig. 2D, 3A and 5A, Supplementary Fig. S1, S2 and S3). Box plot and statistical

427 analyses for fluorescence anisotropy data were performed with Qtiplot software (Fig. 4B,
428 Supplementary Fig. S4).

429 **References**

430 Allan, B., Linseman, M., MacDonald, L.A., Lam, J.S., and Kropinski, A.M. (1988) Heat shock response of
431 *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **170**: 3668–3674.

432 Aspedon, A., Palmer, K., and Whiteley, M. (2006) Microarray analysis of the osmotic stress response
433 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 2721–2725.

434 Baldini, R.L., Starkey, M., and Rahme, L.G. (2014) Assessing *Pseudomonas* virulence with the
435 nonmammalian host model: *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1149**: 689–
436 697.

437 Barbey, C., Crépin, A., Cirou, A., Budin-Verneuil, A., Orange, N., Feuilloley, M., et al. (2012) Catabolic
438 pathway of gamma-caprolactone in the biocontrol agent *Rhodococcus erythropolis*. *J.*
439 *Proteome Res.* **11**: 206–216.

440 Barria, C., Malecki, M., and Arraiano, C.M. (2013) Bacterial adaptation to cold. *Microbiol. Read. Engl.*
441 **159**: 2437–2443.

442 Baysse, C., Cullinane, M., Déneraud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., et al. (2005)
443 Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane
444 properties. *Microbiology.* **151**: 2529–2542.

445 Bazire, A., Dheilly, A., Diab, F., Morin, D., Jebbar, M., Haras, D., and Dufour, A. (2005) Osmotic stress
446 and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid
447 biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**: 125–131.

448 Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutera, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L., et al.
449 (2010) The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid
450 *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**: 3001–3010.

451 Beran, R.K. and Simons, R.W. (2001) Cold-temperature induction of *Escherichia coli* polynucleotide
452 phosphorylase occurs by reversal of its autoregulation. *Mol. Microbiol.* **39**: 112–125.

453 Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., et al. (2014) Identification of
454 the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa*
455 pathogenicity. *J. Bacteriol.* **196**: 345–356.

456 Boechat, A.L., Kaihami, G.H., Politi, M.J., Lepine, F., and Baldini, R.L. (2013) A novel role for an ECF
457 sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*.
458 *PloS One* **8**: e84775.

459 Bouffartigues, E., Duchesne, R., Bazire, A., Simon, M., Maillot, O., Dufour, A., et al. (2014) Sucrose
460 favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function
461 sigma factor SigX. *FEMS Microbiol. Lett.* **356**: 193-200.

462 Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., et al. (2012) Transcription
463 of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor
464 and is sucrose induced. *J. Bacteriol.* **194**: 4301–4311.

465 Bouffartigues, E., Moscoso, J.A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompte, L., Gicquel, G., et al. (2015)
466 The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm
467 formation through variation in c-di-GMP level. *Front. Microbiol.* **6**: 630.

468 Brinkman, F.S., Schoofs, G., Hancock, R.E., and De Mot, R. (1999) Influence of a putative ECF sigma
469 factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa*
470 and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **181**: 4746–4754.

471 Chan, K.-G., Priya, K., Chang, C.-Y., Abdul Rahman, A.Y., Tee, K.K., and Yin, W.-F. (2016) Transcriptome
472 analysis of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown at both body and elevated temperatures.
473 *PeerJ* **4**: e22223.

474 Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., et al. (2018)
475 Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*
476 *Gene Regul. Mech.* **1862** : 706-721.

477 Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., et al. (2017)
478 Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.*
479 **41**: 698–722.

480 Crabbé, A., Pycke, B., Van Houdt, R., Monsieurs, P., Nickerson, C., Leys, N., and Cornelis, P. (2010)
481 Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves
482 AlgU regulation. *Environ. Microbiol.* **12**: 1545–1564.

483 Dise, C.A. and Goodman, D.B. (1985) The relationship between valinomycin-induced alterations in
484 membrane phospholipid fatty acid turnover, membrane potential, and cell volume in the
485 human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **260**: 2869–2874.

486 El Khoury, M., Swain, J., Sautrey, G., Zimmermann, L., Van Der Smissen, P., Décout, J.-L., and Mingeot-
487 Leclercq, M.-P. (2017) Targeting Bacterial Cardiolipin Enriched Microdomains: An
488 Antimicrobial Strategy Used by Amphiphilic Aminoglycoside Antibiotics. *Sci. Rep.* **7**: 10697.

489 Esposito, S. and De Simone, G. (2017) Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment
490 options. *Infez. Med. Riv. Period. Eziologia Epidemiol. Diagn. Clin. E Ter. Delle Patol. Infett.* **25**:
491 301–310.

492 Firoved, A.M., Boucher, J.C., and Deretic, V. (2002) Global genomic analysis of AlgU (sigma(E))-
493 dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for
494 inflammatory processes in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **184**: 1057–1064.

495 Fléhard, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., et al. (2018) The
496 absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in
497 *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **8**: 17212.

498 Follonier, S., Escapa, I.F., Fonseca, P.M., Henes, B., Panke, S., Zinn, M., and Prieto, M.A. (2013) New
499 insights on the reorganization of gene transcription in *Pseudomonas putida* KT2440 at
500 elevated pressure. *Microb. Cell Factories* **12**: 30.

501 Gao, H., Yang, Z.K., Wu, L., Thompson, D.K., and Zhou, J. (2006) Global transcriptome analysis of the
502 cold shock response of *Shewanella oneidensis* MR-1 and mutational analysis of its classical
503 cold shock proteins. *J. Bacteriol.* **188**: 4560–4569.

504 Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., et al. (2013) The extra-
505 cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-related properties in
506 *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**: e80407.

507 Han, K., Tjaden, B., and Lory, S. (2016) GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of
508 bacterial small regulatory RNA by in vivo proximity ligation. *Nat. Microbiol.* **2**: 16239.

509 Hancock, R.E. and Carey, A.M. (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-
510 mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140**: 902–910.

511 Huang L., Zhao L., Qi W., Xu X., Zhang J., Zhang J. Qingpi Y. (2020) Temperature-specific expression of
512 cspA1 contributes to activation of sigX during pathogenesis and intracellular survival in
513 *Pseudomonas plecoglossicida*. *Aquaculture* **518**: 734-861.

514 Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., et al. (2003)
515 Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
516 *U. S. A.* **100**: 14339–14344.

517 Jaouen, T., Dé, E., Chevalier, S., and Orange, N. (2004) Pore size dependence on growth temperature
518 is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and
519 mesophilic *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6665–6669.

520 Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., et al. (2014) CHIP-Seq and RNA-Seq
521 reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by
522 *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **10**: e1003984.

523 Kazakov, A.E., Rodionov, D.A., Alm, E., Arkin, A.P., Dubchak, I., and Gelfand, M.S. (2009) Comparative
524 Genomics of Regulation of Fatty Acid and Branched-Chain Amino Acid Utilization in
525 *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.* **191**: 52–64.

526 Kindrachuk, K.N., Fernández, L., Bains, M., and Hancock, R.E.W. (2011) Involvement of an ATP-
527 dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in
528 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 1874–1882.

529 Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., and Venturi, V. (2005) Novel target genes of PsrA
530 transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**: 175–181.

531 Koprowski, P., Sliwinska, M.A., and Kubalski, A. (2015) Negative and positive temperature dependence
532 of potassium leak in MscS mutants: Implications for understanding thermosensitive channels.
533 *Biochim. Biophys. Acta* **1848**: 1678–1686.

534 Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., and Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect
535 both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:
536 3592–3597.

537 Los, D.A. and Murata, N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental
538 signals. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**: 142–157.

539 Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin.*
540 *Microbiol. Rev.* **15**: 194–222.

541 Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V., and Xu, Y. (2009) DOOR: a database for prokaryotic operons.
542 *Nucleic Acids Res.* **37**: D459-463.

543 Martinac, B., Nomura, T., Chi, G., Petrov, E., Rohde, P.R., Battle, A.R., et al. (2014) Bacterial
544 mechanosensitive channels: models for studying mechanosensory transduction. *Antioxid.*
545 *Redox Signal.* **20**: 952–969.

546 Martínez-Granero, F., Redondo-Nieto, M., Vesga, P., Martín, M., and Rivilla, R. (2014) AmrZ is a global
547 transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P.*
548 *fluorescens* F113. *BMC Genomics* **15**: 237.

549 Massier, S., Rincé, A., Maillot, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Chevalier, S. (2012) Adaptation of
550 *Pseudomonas aeruginosa* to a pulsed light-induced stress. *J. Appl. Microbiol.* **112**: 502–511.

551 Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., and Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data
552 generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**: 1372–1374, 1376, 1378–1379.

553 O’Connor, K., Fletcher, S.A., and Csonka, L.N. (2009) Increased expression of Mg(2+) transport proteins
554 enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*
555 *A.* **106**: 17522–17527.

556 Quénée, L., Lamotte, D., and Polack, B. (2005) Combined *sacB*-based negative selection antibiotic
557 marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**:
558 63–67.

559 Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., et al. (2000) Plants and
560 animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
561 **97**: 8815–8821.

562 Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H., and Blattner, F.R. (1999) Genome-wide expression
563 profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3821–3835.

564 Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., et al. (2015) Elucidation of sigma
565 factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with
566 limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog.* **11**: e1004744.

567 Schurr, M.J. and Deretic, V. (1997) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinate regulation of
568 heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*
569 **24**: 411–420.

570 Schurr, M.J., Yu, H., Boucher, J.C., Hibler, N.S., and Deretic, V. (1995) Multiple promoters and induction
571 by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (sigma E) which controls
572 mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 5670–5679.

573 Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo
574 Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* **1**:
575 784–791.

576 Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P., and Bläsi, U. (2006) Hfq-
577 dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in
578 *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **59**: 1542–1558.

579 Spiers, A.J., Buckling, A., and Rainey, P.B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*
580 **146**: 2345–2350.

581 Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., and Mascher, T. (2009) The third pillar of
582 bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor
583 protein family. *Mol. Microbiol.* **74**: 557–581.

584 Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al. (2000) Complete
585 genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:
586 959–964.

587 Tart, A.H., Blanks, M.J., and Wozniak, D.J. (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ
588 (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic
589 fibrosis isolates. *J. Bacteriol.* **188**: 6483–6489.

590 VanBogelen, R.A. and Neidhardt, F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in
591 *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 5589–5593.

592 White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J., and Young, S. (2008) Low
593 temperature (23° C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes
594 in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**: 148–166.

595 Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S. (2016) Enhanced
596 annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the
597 *Pseudomonas* genome database. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative
598 analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* **44**:
599 D646-653.

600 Wood, L.F. and Ohman, D.E. (2015) Cell wall stress activates expression of a novel stress response
601 facilitator (SrfA) under σ_{22} (AlgT/U) control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **161**:
602 30–40.

603 Wood, L.F. and Ohman, D.E. (2009) Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation
604 by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **72**: 183–
605 201.

606 Wurtzel, O., Yoder-Himes, D.R., Han, K., Dandekar, A.A., Edelheit, S., Greenberg, E.P., et al. (2012) The
607 single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body
608 temperature. *PLoS Pathog.* **8**: e1002945.

609 Yuan, Y., Sachdeva, M., Leeds, J.A., and Meredith, T.C. (2012) Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas*
610 *aeruginosa* is initiated by the FabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J.*
611 *Bacteriol.* **194**: 5171–5184.

612 **Acknowledgements**

613 DT and RD Duchesne were recipients of doctoral fellowships from the Région Normandy, COA from
614 Campus France and FUNAI (Nigeria), AT of a post-doctoral fellowship from European Union (FEDER)
615 and Région Normandy. This work was supported by grants from the Evreux Portes de Normandie
(France), the Con

622 **Tables**623 **Table 1: List of identified proteins differentially expressed under CS in *P. aeruginosa* H103.** Spots

624 with an average fold change above 1.5 were considered. Standard deviations were calculated from

625 three biological replicates.

Pseudocap	Spot Number	PA number	Protein name	Putative function	Fold change CS/Control	Standard deviation
Energy metabolism	1	PA2951	EtfA	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit	2.33	0.3
	2	PA0552	Pgk	3-phosphoglycerate kinase	3.93	0.16
	3	PA2953	EtfD	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	2.85	0.5
Amino acid biosynthesis and metabolism	4	PA5171	ArcA	Arginine deiminase	0.29	0.14
	5	PA0865	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3.25	1.43
Fatty acid and phospholipid metabolism	6	PA3639	AccA	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit)	3.21	0.44
Translation, post-translational modification, degradation	7	PA3655	Tsf	Elongation factor Ts	1.69	0.03
	8	PA4265	TufA	Elongation factor Tu	2.43	0.18
	9	PA4740	Pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1.61	0.09

626

627 **Figures legends**

628 **Fig. 1: Effect of HS and CS on *cmaX-cfrX-cmpX* expression *P. aeruginosa* H103.** Histograms show
629 the means of normalized expression for each gene in HS (A) or CS (B) relatively to the control condition
630 at 37°C as calibrator. Error bars indicate SEM of mean, n=4. Significant differences between the sets
631 of normalized expression obtained in each stress condition were calculated against those obtained at
632 37°C using a two-tailed t-test, and P value are indicated by * or *** if < 0.05 or 0.0001, respectively. The
633 symbol ° is indicated for non-significant results.

634 **Fig. 2. At least two promoter regions control the transcription of *cmaX*, *cfrX* and *cmpX* in *P.***
635 ***aeruginosa* H103.** (A) Schematic representation of the genomic environment of the predicted operon
636 *cmaX-cfrX-cmpX* of *P. aeruginosa*. Large arrows indicate the direction of transcription of the ORFs,
637 loops show the position of the putative rho-independent transcription terminators (T1 and T2), and the
638 vertical black rectangles represent the two BPROM predicted promoters. (B) Sequences of the two
639 putative promoters *PcmaX* and *PcfrX*. Predicted -35 and -10 motifs using BPROM are in bold case and
640 underlined, the DNA-binding motif for AlgU is surrounded in black and TSSs are indicated by arrows.
(C) Electrophoregrams obtained from 5'

656 n=3, error bars indicate SD. (B) Histograms show the means of normalized expression relatively to
657 H103 at 37°C as calibrator (white bars) for some known *algU* targets (red frame) and the studied operon
658 (green frame) in H103 (red line) and in $\Delta algU$ mutant exposed (dashed back bars) or not (dashed white
659 bars) to HS. For (B) and (C): NT: not treated. Errors bars indicate SEM, n=4. Significant differences
660 between the sets of normalized expression obtained in HS condition were calculated against those
661 obtained at 37°C for H103 using a two-tailed t-test and P value, which are indicated by *, ** or *** if <
662 0.05, 0.001 or 0.0001, respectively. The symbol ° is indicated for non-significant results.

663 **Fig. 4: *sigX* is up-regulated in response to CS and valinomycin promoting membrane stiffening.**

664 (A) Effect of thermal shocks on *sigX* expression and activity. Grey and black bars represent the mean
665 normalized expression for *sigX* and its targets after CS or HS relatively to those obtained for H103 at
666 37°C (dotted and white bars). NT: not treated. Errors bars indicate SEM, n=4. Significant differences
667 between the sets of normalized expression obtained in each stress condition were calculated against
668 those obtained at 37°C using a two-tailed t-test and P value, which are indicated by *, ** or *** if < 0.05,
669 0.001 or 0.0001, respectively. The symbol ° is indicated for non-significant results. (B) TMA-DPH and
670 DPH anisotropies was used to evaluate the effect of 45 μ M valinomycin on membrane fluidity two hours
671 after the addition of the membrane acting-agent to mid-log phase cultures. Values obtained from
672 unexposed cultures are indicated NT: not treated. Box plots correspond to each sets of data from three
673 independent experiments. Means, medians and min/max anisotropies values are indicated by squares,
674 lines and crosses, respectively. Significant differences between each condition were calculated using a
675 two-tailed t-test and P value, which are indicated by * if < 0.05. The symbol ° is indicated for non-
676 significant results. (C) Relative expression of *sigX* after 2h of exposure to 45 μ M valinomycin. NT: not
677 treated. Error bars indicate SEM, n=3, P value is calculated by two-tailed t-test and is indicated by ** if
678 < 0.001.

679 **Fig. 5: Involvement of SigX in *cmaX*, *cfrX* and *cmpX* and *amrZ* regulation under CS.**

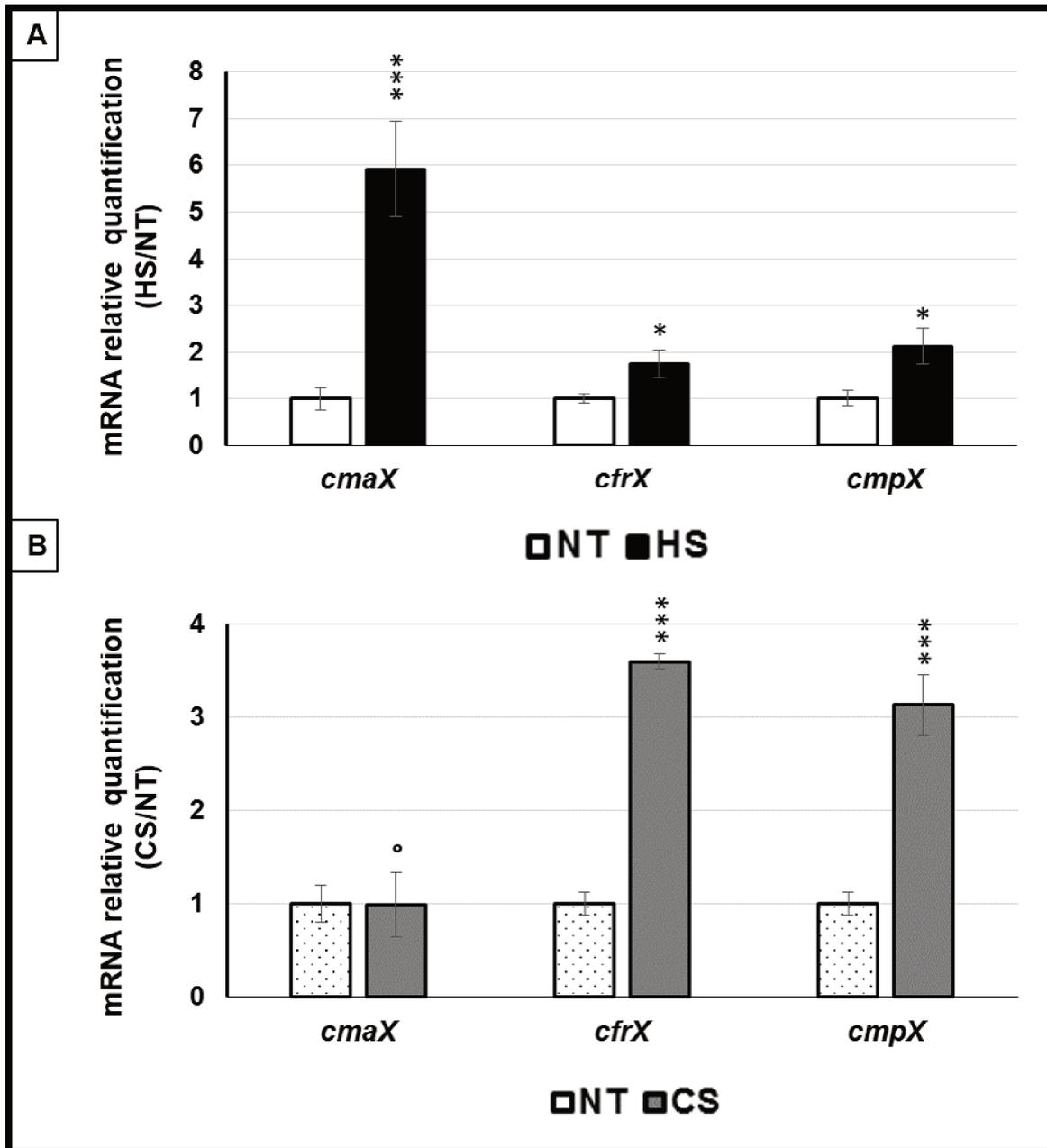
680 (A) Growth of H103 (black squares, dashed line) and PAOSX *sigX* mutant (grey squares) in LB at 37°C and activity
681 pattern of the promoter region upstream *cfrX* in H103 (dashed line) and PAOSX (black circles)
682 background. N=3, error bars indicate SD. (B) Means of normalized expression relatively to H103 at
683 37°C (dotted white bars) of *sigX* and its targets (blue frame) and genes belonging to the operon (green
684 frame), in H103 (red line) and in PAOSX exposed (dashed back bars) or not (dashed white bars) to CS.

685 NT: not treated. (C) White bars show mean normalized *amrZ* expression (relative to H103 at 37°C) in
686 H103 or PAOSX exposed or not to CS. (B) and (C) Error bars indicate SEM for n=4, P value were
687 calculated by two-tailed t-test and are indicated by *, ** or *** if < 0.05, 0.001 or 0.0001, respectively.
688 The symbol ° is indicated for non-significant results.

689 **Fig. 6: Predicted model depicting the molecular mechanisms involved in the regulation of *cmaX*-**
690 ***cfrX-cmpX* in response to HS and CS.** Red and green lines correspond to negative or positive
691 regulation, respectively.

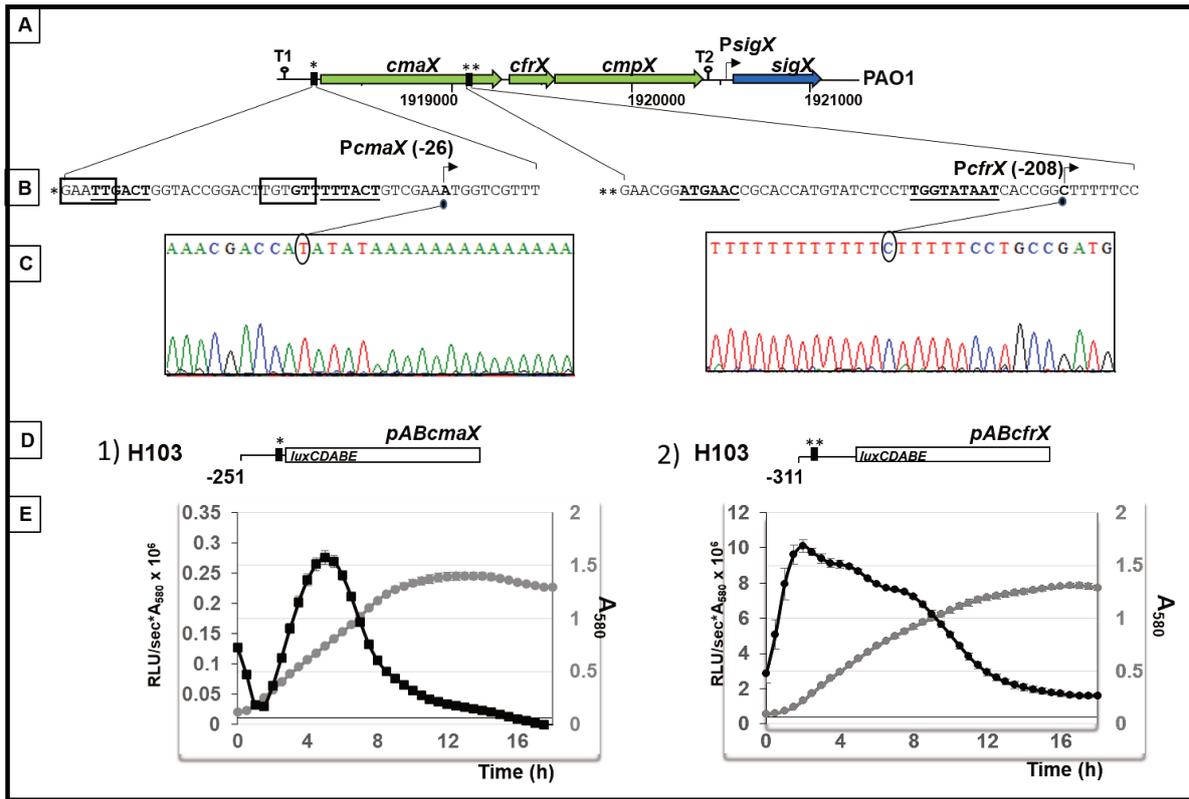
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720

Figure 1



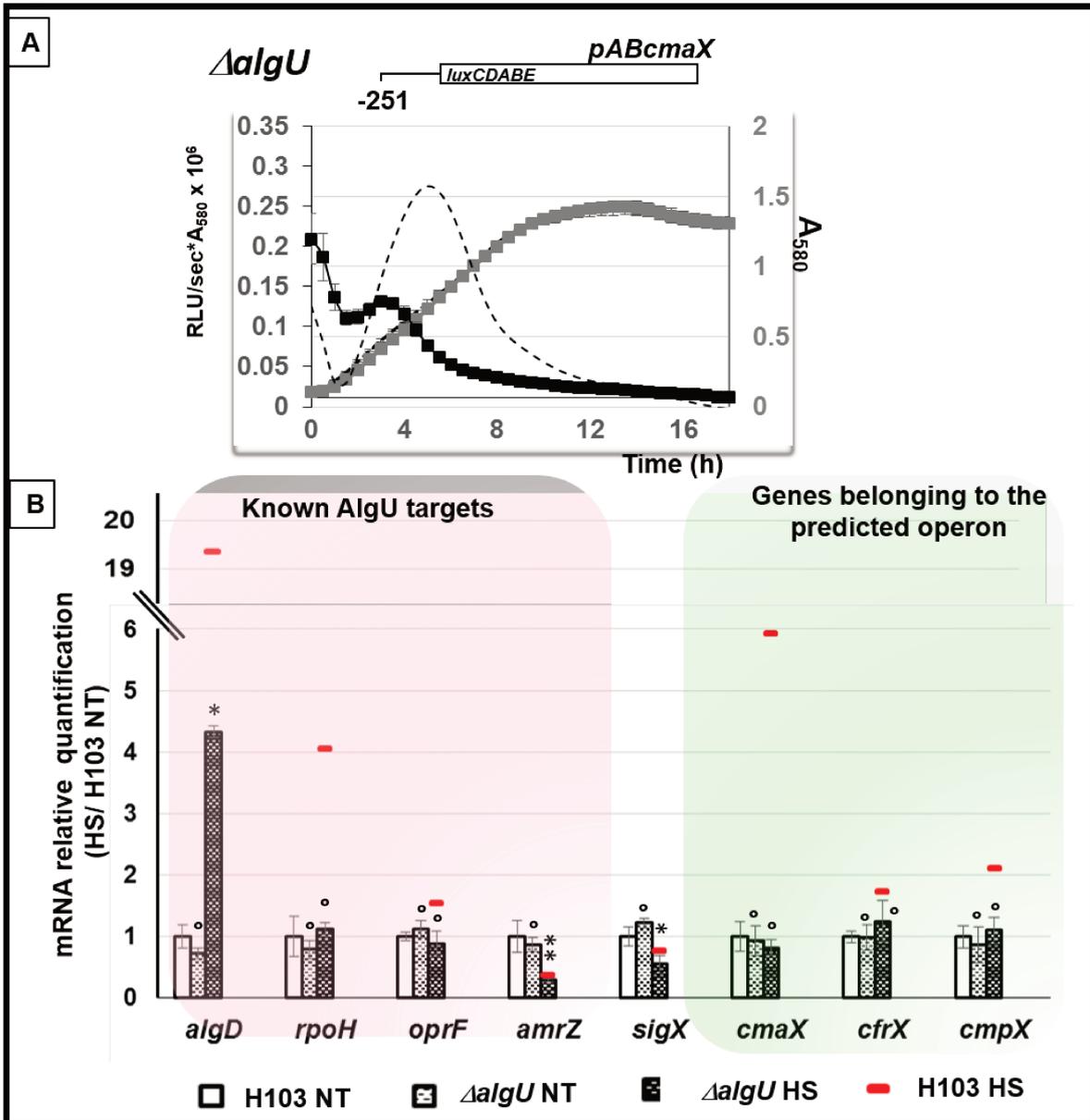
721

Figure 2



722

Figure 3



723

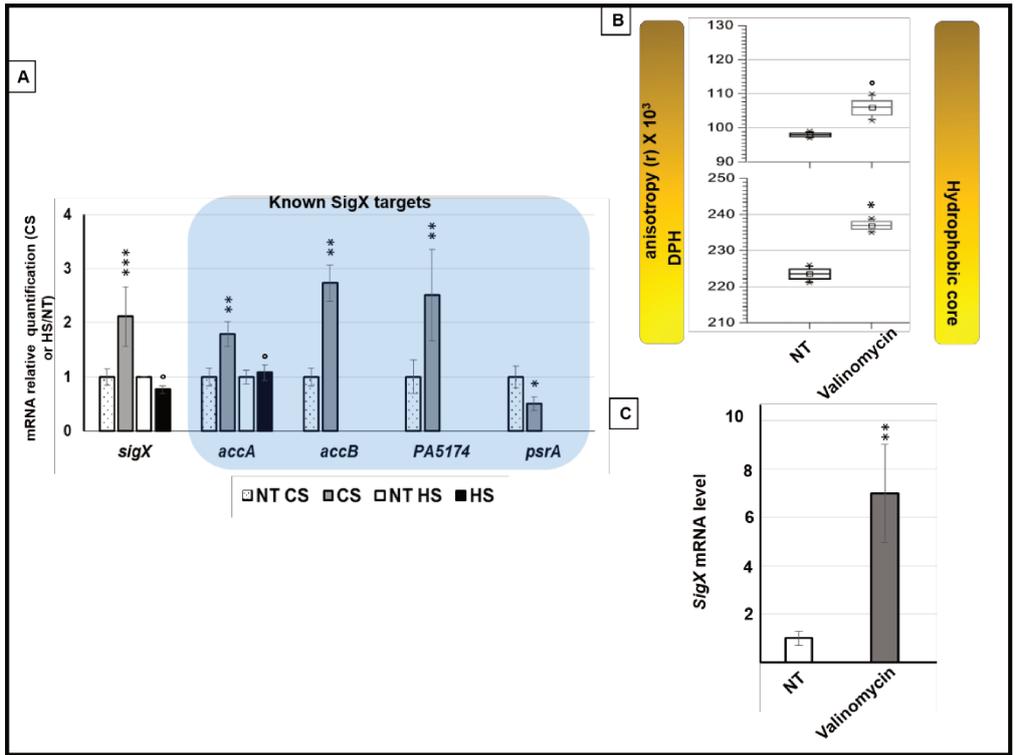
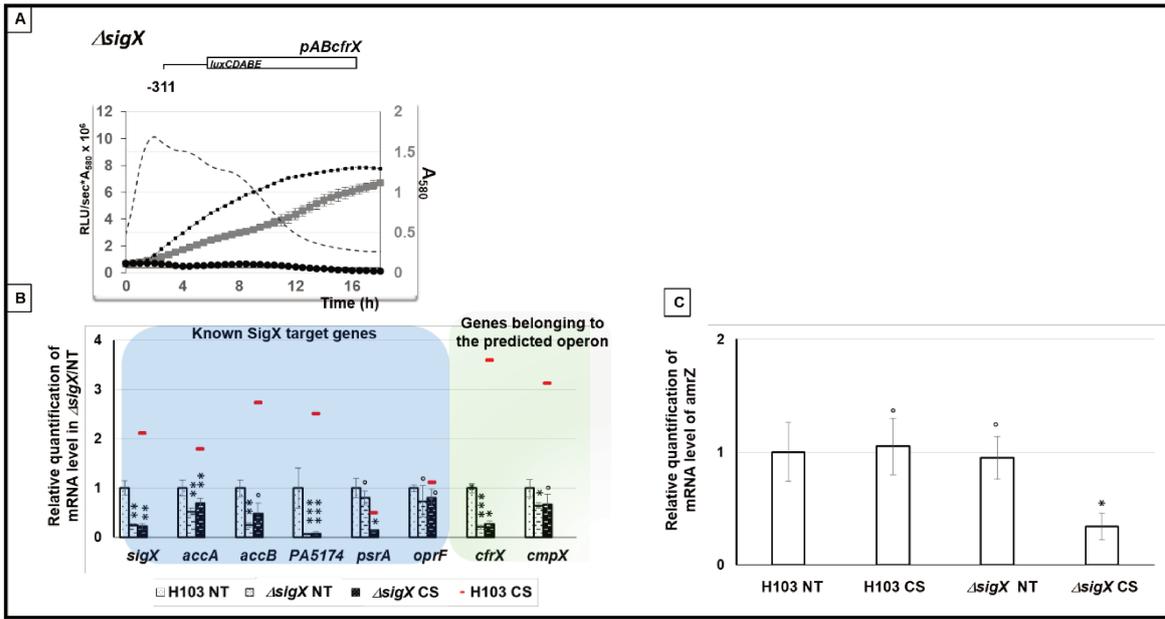


Figure 4

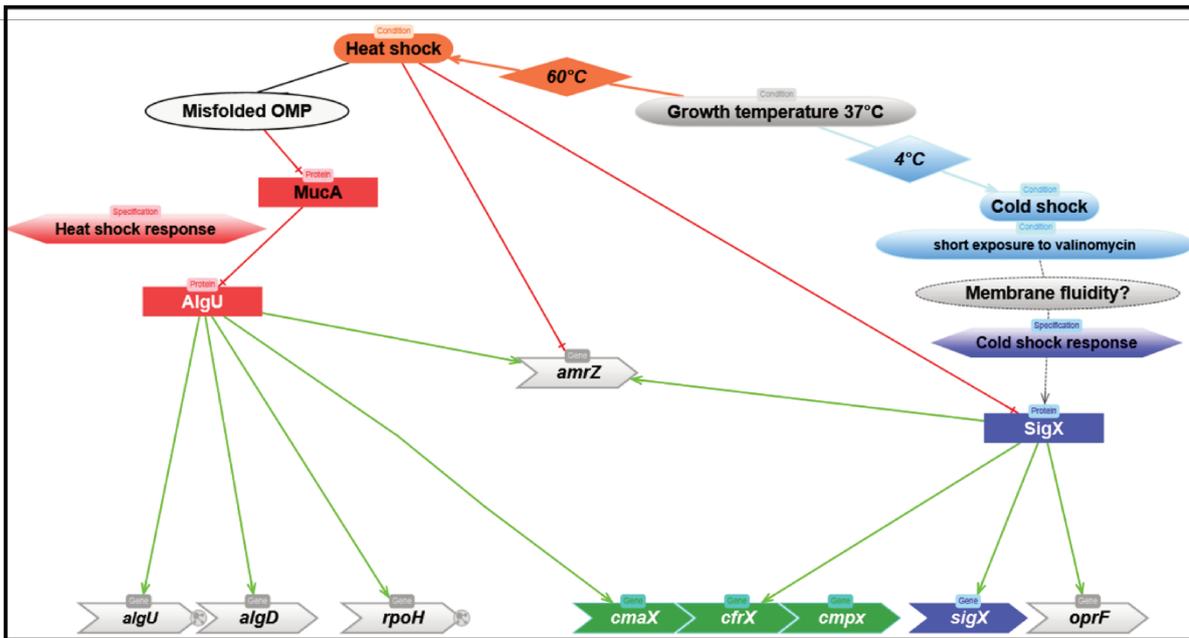
724
725
726
727
728
729
730
731
732

Figure 5



733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743

Figure 6



744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768

The temperature-regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *cmaX-cfrX-cmpX* operon reveals an intriguing molecular network involving the sigma factors AlgU and SigX

Emeline Bouffartigues, Ishac Si Hadj Mohand, Olivier Maillot, Damien Tortuel, Jordane Omnes, Audrey David, Ali Tahrioui, Michael Nusser, Gerald Brenner-Weiss, Rachel Duchesne, Cecil Onyedikachi Azuama, Nathalie Connil, Olivier Lesouhaitier, Alexis Bazire, Nicole Orange, Marc GJ Feuilloley, Alain Dufour, Pierre Cornelis, Sylvie Chevalier

SUPPLEMENTARY DATA

Table of contents

	Pages
Supplementary Table 1: Normalized expression of the studied genes under HS or CS in the indicated genetic background relative to <i>P. aeruginosa</i> H103 at 37°C	2
Supplementary Table 2: Characteristics of proteins identified by Maldi-TOF analysis	3
Supplementary Table 3: Bacterial strains and plasmids used in this study	4-5
Supplementary Table 4: Primer sequences of the indicated genes used for quantitative RT-qPCR reactions, transcription start sites identification and transcriptional fusions construction	6-7
Supplementary Figure S1: Flow cytometry analysis of <i>P. aeruginosa</i> H103 viability exposed or not to CS or HS	8
Supplementary Figure S2: Effect of HS and CS on <i>algU</i> expression and activity	10
Supplementary Figure S3: RpoH is not involved in the <i>cmaX</i>, <i>cfrX</i> and <i>cmpX</i> regulation in response to HS in PAO1.	11
Supplementary Figure S3: 2-DE total protein profiles of <i>P. aeruginosa</i> exposed to CS from 37°C to 4°C or not (control)	12
Supplementary Figure S4: Effect of a sublethal dose of valinomycin on membrane fluidity measured by fluorescence polarization in stationary growth phase	13

Supplementary Table 1: Normalized expression of the studied genes under HS or CS in the indicated genetic backgrounds relative to *P. aeruginosa* H103 at 37°C. Values are means \pm SEM for at least three independent experiments.

Target genes	Treatment	Genetic background		
		H103	$\Delta algU$	$\Delta sigX$
<i>cmaX</i>	HS	5.9 \pm 1	0.9 \pm 0.2	
	CS	1 \pm 0.4		
<i>cfrX</i>	HS	1.7 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	
	CS	3.6 \pm 0.08		1.3 \pm 0.1
<i>cmpX</i>	HS	2.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	
	CS	3.1 \pm 0.3		1. \pm 0.3
<i>algU</i>	HS	2.9 \pm 1.7		
	CS	1.4 \pm 0.7		
<i>algD</i>	HS	19.4 \pm 6.3	6 \pm 0.5	
	CS	1.5 \pm 0.3		
<i>rpoH</i>	HS	4 \pm 1.2	1.4 \pm 0.3	
	CS	1.3 \pm 0.4		
<i>oprF</i>	HS	1.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	
	CS	1 \pm 0.1		
<i>amrZ</i>	HS	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.03	
	CS	1 \pm 0.3		
<i>sigX</i>	HS	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	
	CS	2 \pm 0.6		0.9 \pm 0.2
<i>accA</i>	HS	1 \pm 0.1		
	CS	1.8 \pm 0.2		1.4 \pm 0.1
<i>accB</i>	HS			
	CS	2.7 \pm 0.3		1.9 \pm 0.8
PA5174	HS			
	CS	2.5 \pm 0.8		1.2 \pm 0.5
<i>psrA</i>	HS			
	CS	0.5 \pm 0.1		0.2 \pm 0.02

Supplementary Table 2: Characteristics of proteins identified by Maldi-TOF analysis. MS and MS/MS correspond to the mass spectrometry method used for the protein identification.

Spot number	RefSeq	PA number	Protein name	Theoretical MW (kDa)/pI	method	Protein Score	Number of Matched peptides	Sequence coverage (%)
1	NP_251641.1	PA2951	EtfA	31.4/4.75	MS/MS	111	1	5
2	NP_259243.1	PA0552	Pgk	40.4/5.06	MS/MS	123	2	5
3	NP_251641.1	PA2953	EtfD	59.9/5.6	MS/MS	132	3	8
4	NP_253858.1	PA5171	ArcA	46.4/5.5	MS	183	17	46
5	NP_249556.1	PA0865	Hpd	39.9/4.89	MS	133	12	38
6	NP_252329.1	PA3639	AccA	34.9/5.15	MS	121	11	41
7	NP_252345	PA3655	Tsf	30.7/4.95	MS	92	7	26
8	NP_252955	PA4265	TufA	43.3/5.03	MS	202	15	46
9	NP_253428.1	PA4740	Pnp	75.4/4.81	MS	121	14	23

Supplementary Table 3: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Cb^r, carbenicillin resistance; Gm^r, gentamycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance.

Strains/plasmids	Relevant characteristic(s)	Sources
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM109	Cloning host	Promega
S17.1	Conjugation strain	Simon et al., 1983
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
H103	PAO1 derivative	Hancock, R. E. & Carey, 1979
PAO1	PAO1 derivative	Jacobs, M. A. et al., 2003
$\Delta sigX$ (PAOSX)	PAO1 H103 $\Delta sigX$	Bouffartigues et al., 2012
$\Delta rpoH$	Transposon mutant <i>rpoH::IS;phoA/hah-Tc^r</i>	Jacobs, M. A. et al., 2003
$\Delta algU$	PAO1 H103 $\Delta algU$	This study
Plasmids		
pAB133	Vector for transcriptional fusion analyzes. Gm ^r	Bazire et al., 2005
pABcmaXL	pAB-PcmaX-luxCDABE. Gm ^r	This study
pABcfrXL	pAB-PcfrX-luxCDABE. Gm ^r	This study
pABcmpXL	pAB-PcmpX-luxCDABE. Gm ^r	This study
pEXUGL	pEXalgU with <i>lox-aacC1-lox</i> cassette. Ap ^r , Gm ^r	Bazire et al., 2010
pCM157	<i>cre</i> expression vector, Tc ^r	Quenée et al., 2005

References for Supplementary Table 3

- Bouffartigues, E. *et al.* Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *J. Bacteriol.* **194**, 4301–4311 (2012).
- Hancock, R. E. & Carey, A. M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140**, 902–910 (1979).
- Jacobs, M. A. *et al.* Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14339–14344 (2003).
- Bazire, A. *et al.* Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 125–131 (2005).
- Quénéée, L., Lamotte, D. & Polack, B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**, 63–67 (2005).
- Bazire, A. *et al.* The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 3001–3010 (2010).
- Simon, R., Prierer, U. & Pühler, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* **1**, 784–791 (1983).

Supplementary Table 4: Primer sequences of the indicated genes used for quantitative RT-qPCR reactions, transcription start sites identification and transcriptional fusions construction.

PA number	Gene name	Primer name	Se
----------------------	----------------------	--------------------	-----------

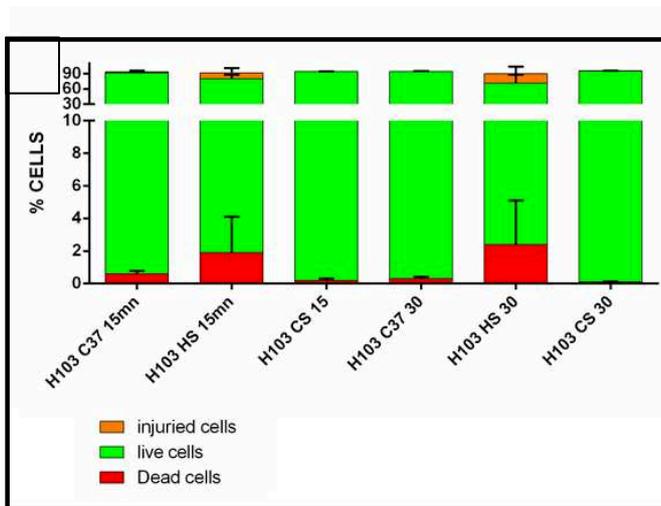
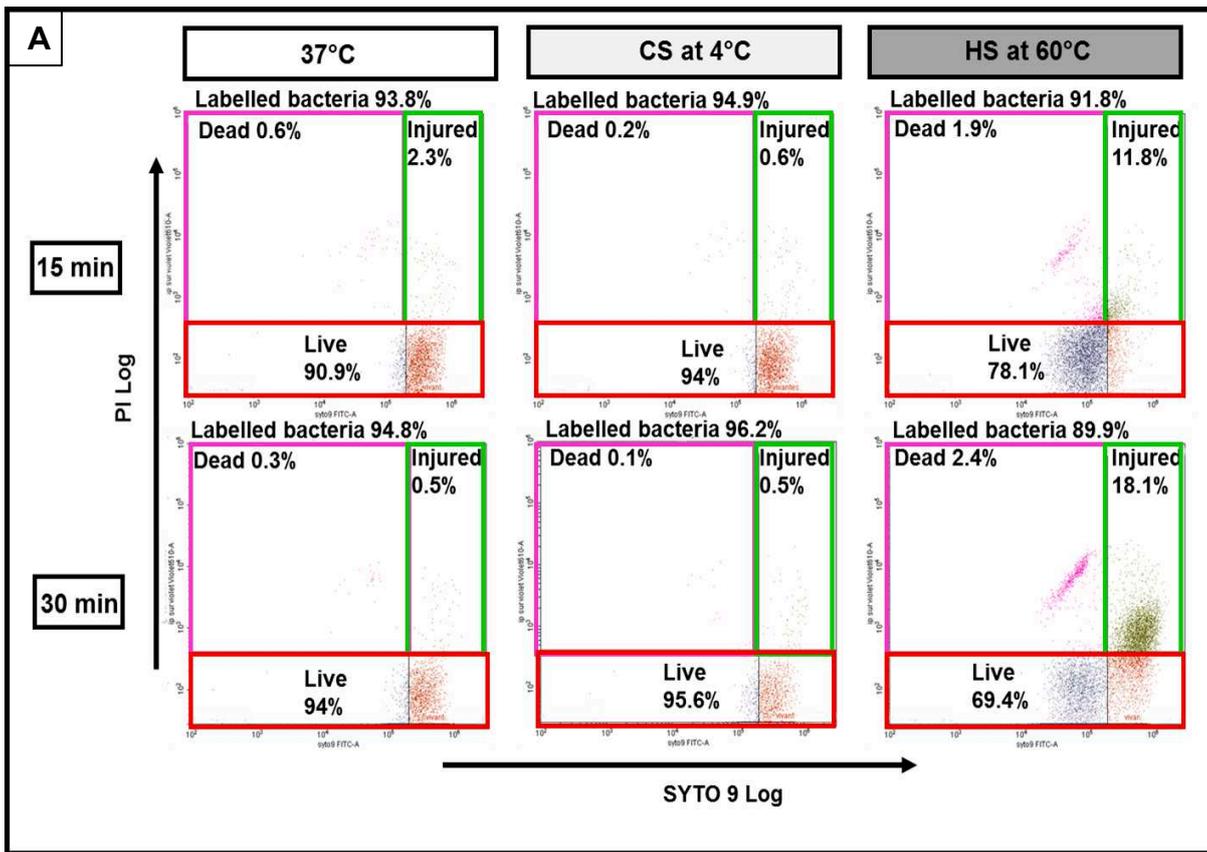
PA1774	<i>cfrX</i>	AS1 <i>cfrX</i>	GCAGAAGATGCGTTTTTCG
		ASP2 <i>cfrX</i>	GCGGAAATACGGGAAACC
PA1773	<i>cmaX</i>	ASP1 <i>cmaX</i>	CAGGTAGTGCGCGAGGTAGT
		ASP2 <i>cmaX</i>	CGGATTCAGGTTCACTCCAC

Transcriptional fusions

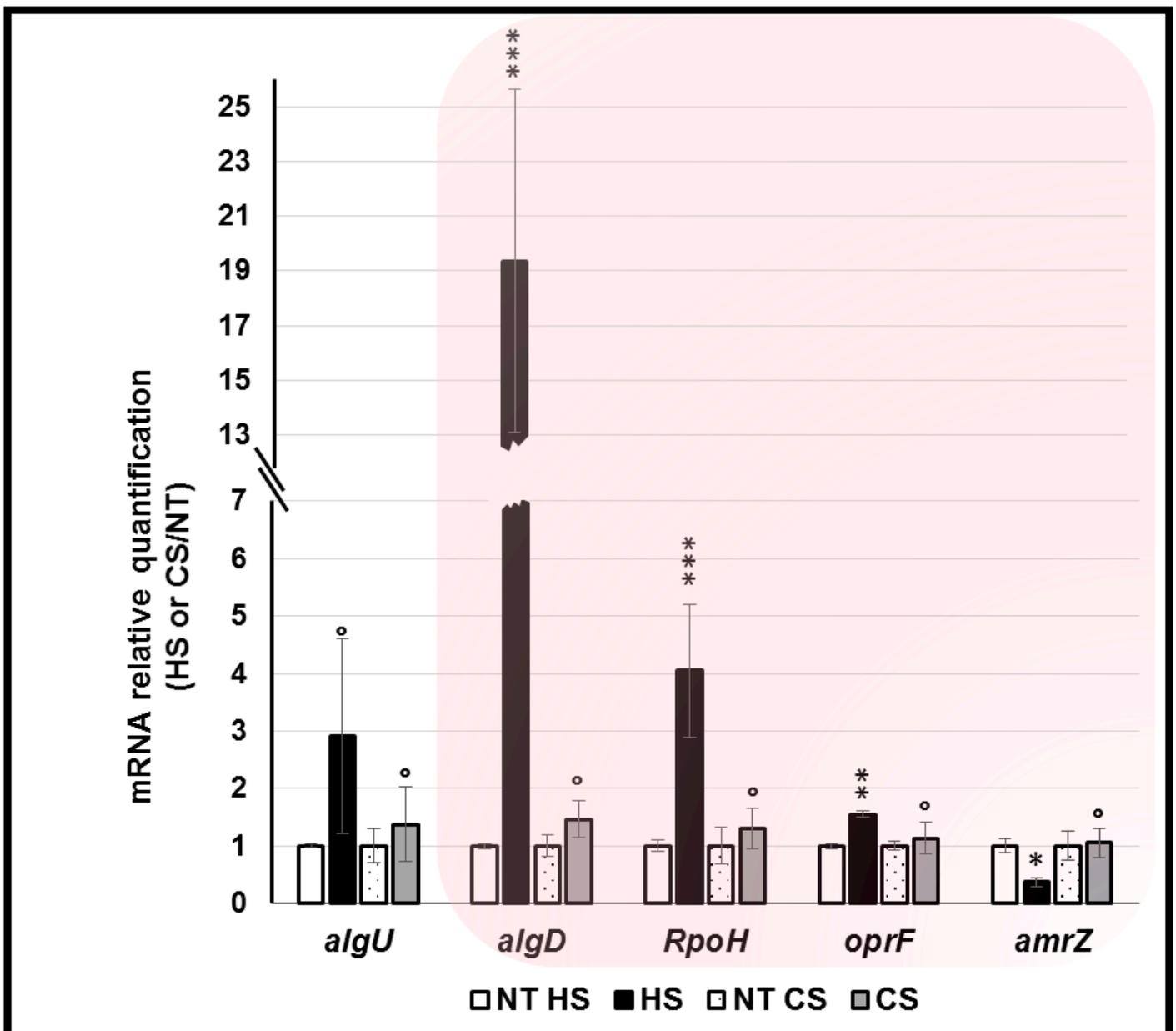
**PA1773	** <i>cmaX</i>	FC <i>cmaX</i>	*taataagagctcGTTTCGTGTATGCCGACAACA
		RC <i>cmaX</i>	*taataactagttGCGCTTCCCTTGGTAAAAC
**PA1774	** <i>cfrX</i>	FCFR <i>X</i>	*taataagagctcGAGTTGATACGGGAGCGCAT
		RCFR <i>X</i>	*taataactagttCATGTCTGTACGAGGGAGTG
**PA1775	** <i>cmpX</i>	FC <i>cmpX</i>	*taataagagctcCTGCGGGACCTGCTCAAG
		RC <i>cmpX</i>	*taataactagttCACTCAGCCTTGTCAGC

* Nucleotides not in the chromosomal sequence are indicated in lower case.

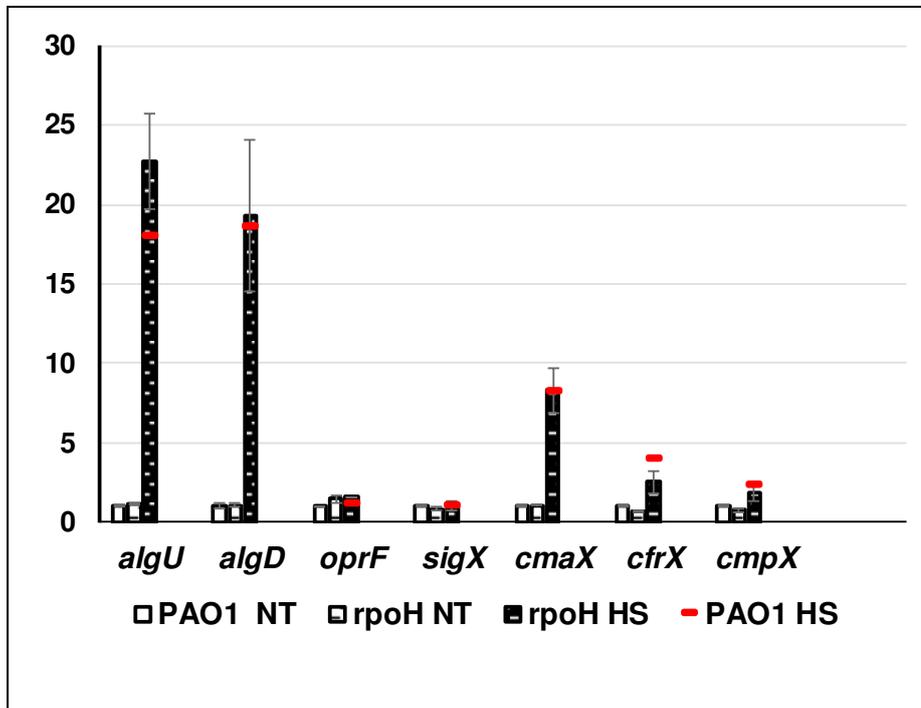
** Gene localized downstream the PCR-amplified DNA fragment



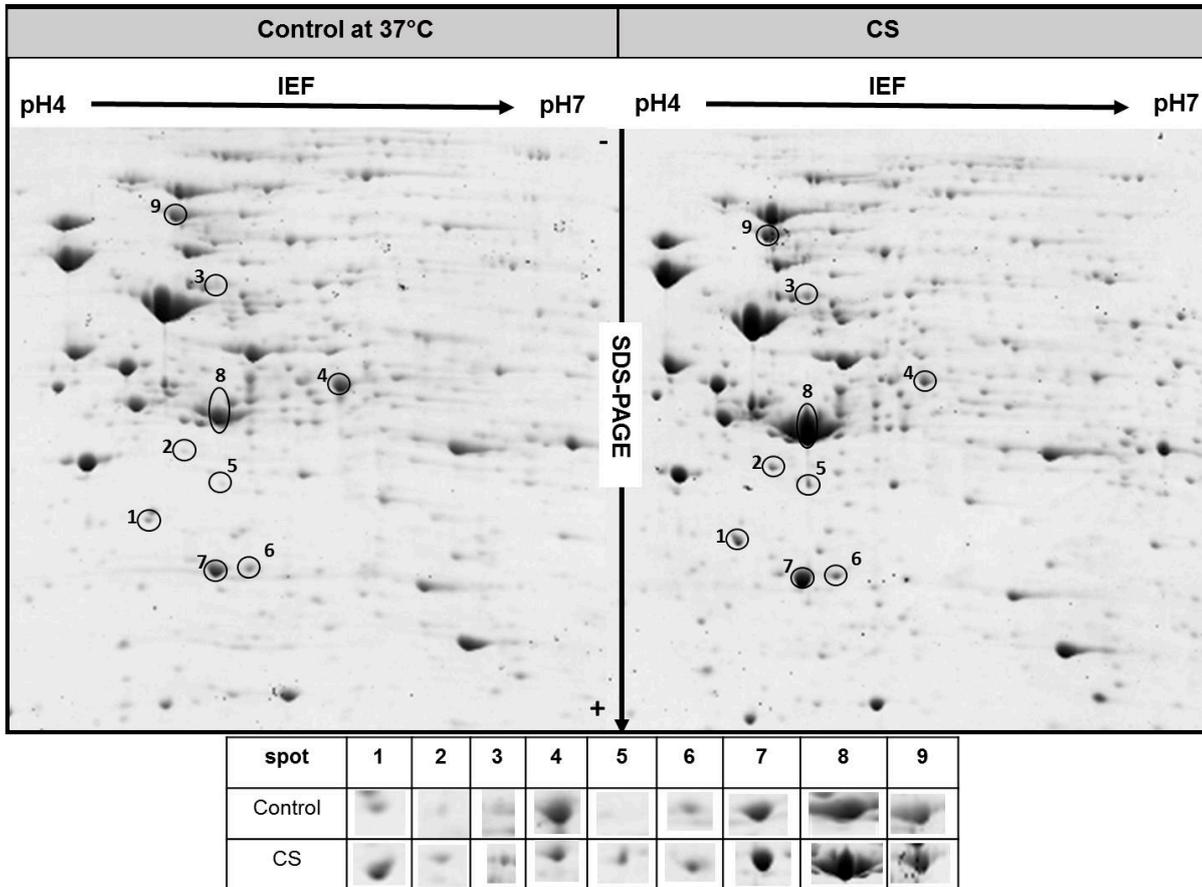
Supplementary Figure S1: Flow cytometry analysis of *P. aeruginosa* H103 viability exposed or not to CS or HS. Bacteria were grown in LB until the mid-log growth phase and subjected to CS or HS as indicated. 10^5 cells were stained using Syto9 and PI and then analysed by flow cytometry. (A) Cytograms are representative of three independent experiments. Live and dead cells emitting a green or a red fluorescence are indicated within a red or purple frame respectively. The green frame corresponds to cells with membrane damages. The mean percentage of live, dead and injured cells is indicated in each frame. (B) Histograms representing percent of cell viability from the experiments of live/dead assays.



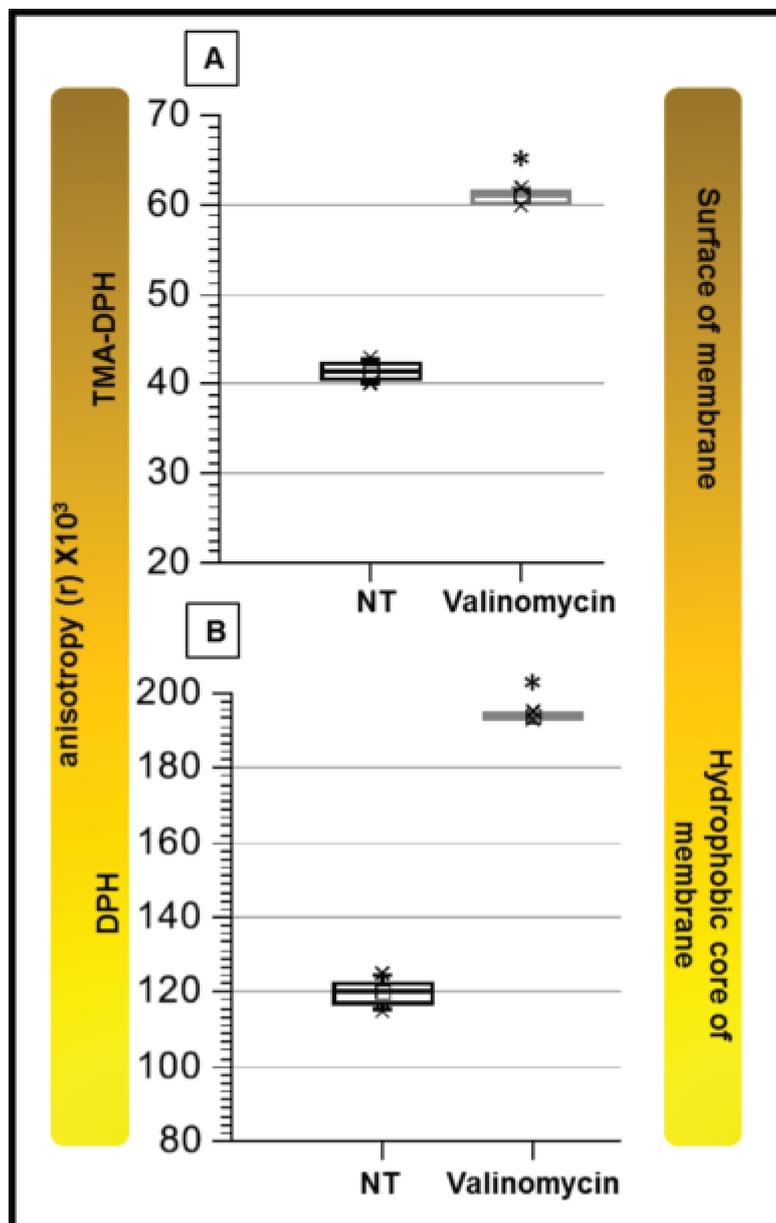
Supplementary Figure S2: Effect of HS and CS on *algU* expression and activity. Black and grey bars show means normalized expression of *algU* and its targets after HS or CS relatively to the control condition at 37°C as calibrator (white and dotted bars). NT: not treated. Error bars indicate SEM, n=4. Significant differences between the sets of normalized expression obtained in each stress condition were calculated against the those obtained at 37°C using a two-tailed t-test, and P value are indicated by *, ** or *** if < 0.05, 0.001 or 0.0001, respectively. The symbol ° is indicated for non-significant results.



Supplementary Figure S3: RpoH is not involved in the *cmaX*, *cfrX* and *cmpX* regulation in response to HS in PAO1. Means of normalized expression for *algU* targets (red frame), the predicted operon (*cmaX-cfrX-cmpX*) and *sigX* in PAO1 (red line) or in an isogenic *rpoH* mutant exposed (dashed back bars) or not (dashed white bars) to HS.



Supplementary Figure S4: 2-DE total protein profiles of *P. aeruginosa* exposed to CS from 37°C to 4°C or not (control). Gels are Coomassie blue stained and are representative of three independent proteins extractions. The protein spots satisfying both statistical biological variation analysis and mass spectroscopy identification scores were numbered according to Table 1 and Supplementary Table 2.



Supplementary Figure S5: Effect of a sublethal dose of valinomycin on membrane fluidity measured by fluorescence polarization in stationary growth phase. TMA-DPH and DPH anisotropies were used to evaluate the effect of 45 μM valinomycin on membrane fluidity twenty two hours after the addition of the membrane acting-agent to mid-log phase cultures. Values obtained from unexposed cultures are indicated as NT: not treated. Box plots correspond to each sets of data from three independent experiments. Means, medians and min/max anisotropies values are indicated by squares, lines and crosses, respectively. Significant differences between each condition were calculated using a two-tailed t-test, and P value are indicated by * if < 0.05 .

3. Rôle du canal mécanosensible CmpX en phase stationnaire de croissance dans l'homéostasie de l'enveloppe chez *P. aeruginosa*

Les canaux ioniques mécanosensibles sont des protéines ubiquitaires dont l'ouverture sous l'effet de contraintes membranaires permet le passage d'ions ou de molécules selon la sélectivité de celui-ci. Chez *Escherichia coli*, le canal de faible conductance MscS est l'un des plus étudiés. Il est impliqué en particulier dans la régulation de la pression de turgescence lors d'un abaissement brusque de l'osmolarité du milieu. Son gène est régulé par RpoS, le facteur sigma de phase stationnaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la fonction de CmpX est relativement peu étudiée (voir partie introduction). Nous avons montré précédemment que son gène fait partie avec *cfrX* d'une unité transcriptionnelle localisée en amont de *sigX* et d'*oprF*. Dans le but de préciser rôle de CmpX, un mutant de délétion a été construit chez la souche H103 et caractérisé aux niveaux moléculaire (RT-qPCR) et phénotypique pour (i) sa résistance à des chocs thermiques, (ii) sa fluidité (polarisation généralisée et de fluorescence) et sa composition membranaire lipidique (FAME) et protéique, (iii) sa production de facteurs de virulence. Nous montrons que l'absence de CmpX provoque des altérations de l'enveloppe en phase stationnaire, et en particulier une diminution de la fluidité des régions profondes du cœur hydrophobe membranaire, activant la réponse au stress d'enveloppe. Ces altérations membranaires sont associées à une diminution de la production de rhamnolipides, un facteur de virulence sous le contrôle du système Rhl. Ces travaux suggèrent que CmpX joue un rôle primordial dans l'homéostasie de l'enveloppe et la pathogénicité chez *P. aeruginosa* dans des conditions de stress telles que la phase stationnaire.

La plupart de ces travaux a été réalisée par Audrey David lors de son stage de Master 2. Ces résultats seront consignés dans un manuscrit pour lequel je serais co-auteur. J'ai contribué à cet article en participant aux alignements de séquences et aux modélisations protéiques *in silico* de CmpX, au test de la goutte dans le cadre des dosages des rhamnolipides et à l'encadrement d'Audrey David.

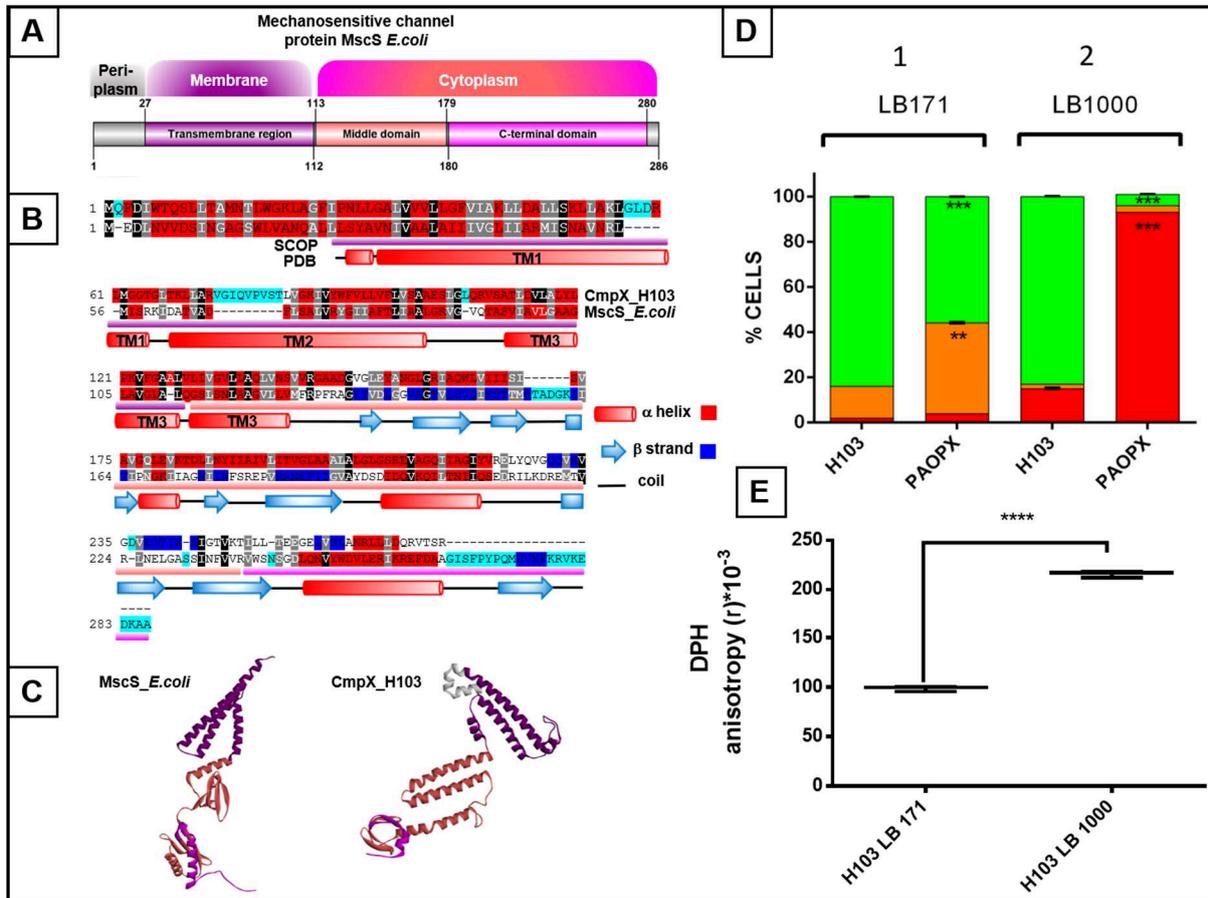


Figure 38. Homologies structurales et fonctionnelles entre CmpX de *P. aeruginosa* et MscS d'*E. coli*.

A. Représentation schématique des domaines architecturaux de MscS d'*E. coli*. Les domaines périplasmique, membranaire et cytoplasmique sont représentés respectivement, en gris, violet et rose. B. Alignement des séquences en acides aminés de CmpX et MscS. Pour CmpX, les acides aminés prédits par le logiciel PRALINE, comme appartenant à des éléments de structure secondaire, sont surlignés en rouge (hélice α) ou en bleu (feuille β). Pour MscS, les domaines architecturaux et la structure secondaire obtenus par cristallographie (PDB) sont visibles en dessous de sa séquence en acides aminés. C. La structure prédictive d'une chaîne de CmpX, obtenue à partir de GalaxyWEB a été comparée à celle de MscS d'*E. coli*, disponible dans la banque PDB. D. La viabilité cellulaire de H103 et PAOPX, cultivés en milieu LB171 ou LB1000 avant un choc hypo-osmotique, a été évaluée par une coloration Live/Dead par cytométrie en flux. E. Anisotropie de fluorescence de H103 cultivé en LB171 ou LB1000, par marquage avec la sonde fluorescente DPH.

a. Résultats

i. CmpX partage des similarités structurales et fonctionnelles avec MscS d'Escherichia coli.

Dans le but de déterminer si CmpX appartient à la famille des canaux mécanosensibles, les similarités structurales et fonctionnelles entre CmpX de *P. aeruginosa* et MscS d'*E. coli* ont été recherchées. MscS forme un homo-heptamère, dans lequel les domaines et la localisation cellulaire, les structures secondaire et tridimensionnelle d'un monomère sont représentées en **Figures 38A, 38B et 38C**, respectivement. Cette protéine transmembranaire est composée de trois parties (**Figure 38A**) : un segment périplasmique faiblement structuré (1-26), une partie insérée dans la membrane cytoplasmique (27-112) composée de trois hélices alpha (TM1, TM2 et TM3), et la portion cytosolique (113-280). Le domaine central est principalement structuré en feuillets β , alors que le domaine C-terminal contient deux hélices α . Basée sur des prédictions de structures secondaire à l'aide du logiciel PRALINE, la topologie d'un monomère de CmpX présenterait cependant au moins une différence remarquable par rapport à celle d'un monomère de MscS. En effet, son domaine central pourrait se replier principalement en hélices α , ce qui n'est pas le cas pour MscS (**Figure 38B et 38C**). Selon ce modèle, l'homo-heptamère de CmpX formerait un canal ouvert ou fermé avec un petit domaine cytoplasmique comparé à celui de MscS (**Figure 39**). Dans le but d'évaluer son rôle dans la résistance aux chocs hypo-osmotiques, la souche sauvage H103 et son mutant isogénique de délétion $\Delta cmpX$, nommé PAOPX (**Tableaux 6 et 11**), ont été cultivés en LB171 (171mM de NaCl, faible osmolarité) ou en LB1000 (1M NaCl, forte osmolarité) jusqu'en phase stationnaire de croissance. Ils ont alors été exposés à un brusque choc hypo-osmolaire (LB0, LB sans NaCl, hypo-osmolarité), comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. La viabilité des cellules a été mesurée par un marquage simultané des acides nucléiques avec du SYTO9 (fluorescence verte) pour lequel les bactéries vivantes sont perméables, et de l'iodure de propidium (IP, fluorescence rouge) qui ne peut pénétrer en quantité que lorsque les structures membranaires sont fortement perméabilisées, ce qui permet d'évaluer la quantité de cellules mortes. Les cellules présentant des structures membranaires altérées sont marquées avec les deux marqueurs. Les pourcentages de cellules fluorescentes dans le vert, le rouge ou les deux pour la souche H103 et PAOPX ont été calculés après l'analyse des différentes populations par cytométrie en flux. Lorsque H103 et PAOPX sont cultivées en milieu LB171 avant d'être exposées à un choc hypo-osmotique, une diminution des cellules vivantes et une augmentation significative des cellules endommagées d'environ 25 % ont été mesurées pour PAOPX par rapport à H103 (**Figure 38D**). Ces résultats suggèrent l'implication de CmpX dans la résistance de H103 à un abaissement de

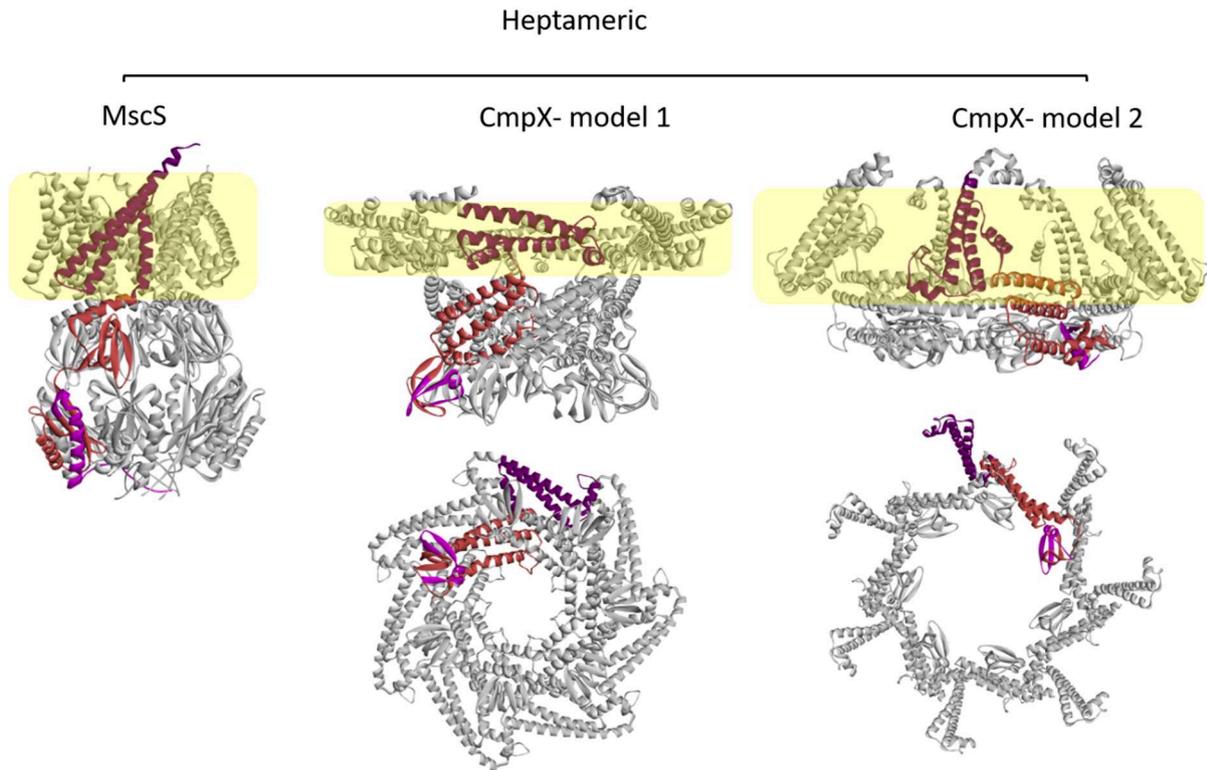


Figure 39. Comparaison des structures tridimensionnelles de MscS d'*E. coli* et de CmpX de *P. aeruginosa*.

La région s'insérant dans la membrane interne est illustrée en jaune. Un monomère de la structure heptamérique est représenté en couleur.

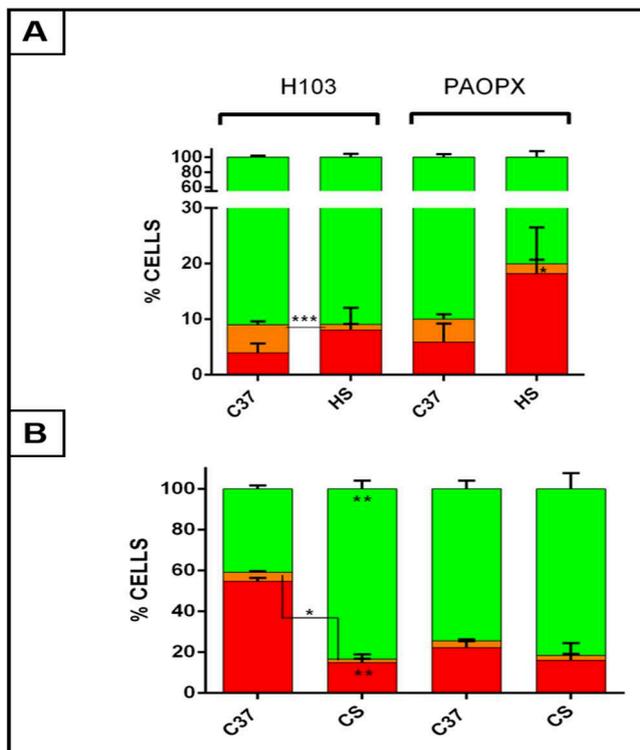


Figure 40. Viabilité cellulaire de H103 et PAOPX après des chocs thermiques.

Viabilité cellulaire (%) de H103 et PAOPX, évaluée par cytométrie en flux (marquage Live/Dead) après incubation (A.) pendant 30 mn à 37°C (condition contrôle, C37) ou un choc chaud (HS) de 30 mn à 50°C ou (B.) pendant 1h30 à 37°C (condition contrôle, C37) ou un choc froid (CS) pendant 1h30 à 4°C.

l'osmolarité du milieu. En cohérence avec ces résultats, une diminution de la viabilité plus importante a été observée lorsque les cellules sont préalablement cultivées en LB1000. En effet, la lyse des cellules de PAOPX a été visuellement observée (données non présentées) et un taux de cellules mortes de 90% a été calculé pour PAOPX alors qu'il n'atteint que 20% pour la souche sauvage (**Figure 38D**). Ces résultats montrent l'implication de CmpX dans un choc hypo-osmotique, en lien avec sa fonction potentielle de canal ionique mécanosensible chez *P. aeruginosa*. Par ailleurs, des expériences d'anisotropie de fluorescence réalisées à l'aide de la sonde DPH sur *P. aeruginosa* H103 cultivée en LB171 ou en LB1000 ont montré une augmentation de la rigidité membranaire en condition d'hyper-osmolarité (**Figure 38E**). Puisque la fluidité membranaire est affectée en réponse à des variations de température, la résistance de H103 et PAOPX à de brusques changements de températures a été étudiée (**Figure 40**). Dans ce but, les bactéries en phase stationnaire de croissance ont été exposées à des chocs thermiques à 50°C pendant 30mn (choc chaud, HS, **Figure 40A**), ou à 4°C pendant 1h30 (choc froid, CS, **Figure 40B**). H103 et PAOPX ont également été exposées à 37°C pendant 30mn ou 1h30, et constituent la condition contrôle des traitements en chocs chaud et froid, respectivement (C37, **Figure 40**). Lorsque cultivées à 37°C, environ 5% de cellules endommagées et/ou mortes ont été mesurées pour H103 et PAOPX, indiquant une proportion similaire de cellules vivantes/mortes pour chaque souche dans cette condition contrôle. Après exposition à un choc thermique chaud, un taux significativement plus faible de cellules endommagées a été mesuré pour la souche de référence alors que le taux de cellules mortes est augmenté de 4%. De manière intéressante, le taux de cellules vivantes reste stable, suggérant que seules les cellules endommagées semblent sensibles dans cette condition (**Figure 40A**). Exposées à un choc thermique chaud, la proportion de cellules de PAOPX mortes et endommagées est de 20 %, soit une augmentation de 10% par rapport à H103 traitée dans les mêmes conditions, montrant que PAOPX pourrait être légèrement plus sensible dans cette condition. Lorsque H103 est incubée pendant 1h30 à 37°C, un taux de 60% de cellules mortes et endommagées est mesuré, suggérant un fort effet létal de cette condition par rapport à une incubation de 30min à 37°C (comparer C37 **Figures 40A** et **40B**). L'incubation à 4°C pendant 1h30 réduit la mortalité de H103 de manière significative de 40%, suggérant que l'abaissement de la température pourrait contribuer à stabiliser les structures membranaires de H103. De manière intéressante, un taux de mortalité faible (20%) a été mesuré pour PAOPX dans la condition témoin et est similaire à celui observé pour H103 incubée à 4°C (C37 et CS, **Figure 40B**). De plus, aucune différence significative des différentes populations n'a été observée pour PAOPX entre 37°C et 4°C (**Figure 40B**). Ces résultats suggèrent que PAOPX pourrait être de

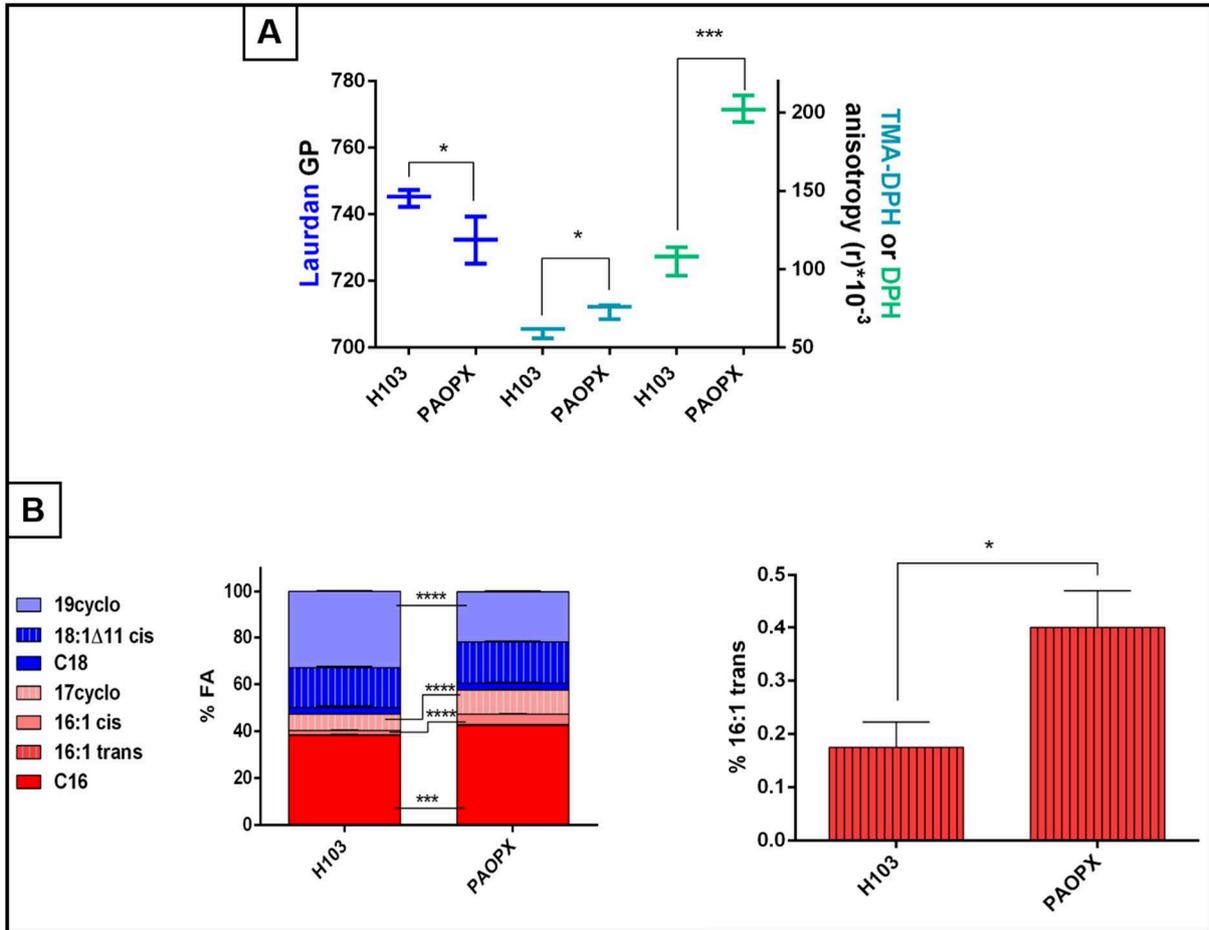


Figure 41. CmpX est impliqué dans la fluidité membranaire et la composition en AG en phase stationnaire de croissance.

A. La fluidité membranaire de H103 et PAOPX a été évaluée par polarisation généralisée (GP) grâce à l'utilisation de la sonde Laurdan, et par anisotropie de fluorescence (r) grâce à l'utilisation des sondes DPH et TMA-DPH. B. Composition en AG des membranes de H103 et PAOPX par FAME.

manière intrinsèque protégée en absence d'incubation dans la glace. De par son implication dans la résistance de *P. aeruginosa* H103 à des variations de condition d'osmolarité et de température, qui sont connues pour influencer la fluidité membranaire, nous avons émis l'hypothèse que CmpX pourrait jouer un rôle dans l'intégrité de l'enveloppe en phase stationnaire.

ii. La structure et la fluidité membranaire sont altérées dans un mutant Δ cmpX en phase stationnaire de croissance.

Trois sondes fluorescentes, le Laurdan, le TMA-DPH et le DPH, ont été utilisées pour leur insertion à différents niveaux dans les bicouches lipidiques afin d'évaluer la fluidité membranaire de H103 et de PAOPX. Le Laurdan s'insère au niveau des squelettes glycérol des phospholipides, le TMA-DPH et le DPH s'insèrent respectivement au niveau de la surface ou dans les régions plus profondes du core-hydrophobe des membranes (**Figure 48**). La mesure de polarisation généralisée (GP, laurdan) ou d'anisotropie de fluorescence (r , TMA-DPH et DPH) étant inversement proportionnelle à la fluidité membranaire, une augmentation de la valeur de GP ou de r traduit une augmentation de la rigidité membranaire, alors qu'une diminution de ces valeurs traduit une augmentation de la fluidité membranaire. H103 et PAOPX ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire de croissance et les valeurs de GP ou de r ont été mesurées. Alors que nous avons mesuré une diminution significative de la valeur de GP de 10 unités chez PAOPX par rapport à la souche sauvage (**Figure 41A**), une augmentation significative de la valeur moyenne d'anisotropie a été mesurée avec les sondes TMA-DPH et DPH, passant respectivement de 60 ± 5 (H103) à 75 ± 5 (PAOPX) et de 110 ± 5 (H103) à 200 ± 2 (PAOPX). Ces résultats montrent l'existence de zones plus fluides chez PAOPX au niveau des squelettes glycérol des phospholipides alors que le core-hydrophobe des membranes semble au contraire plus rigide. Les modifications de fluidité membranaire ainsi mises en évidence chez un mutant Δ cmpX en phase stationnaire, suggèrent que la composition et/ou la structure des membranes pourraient être altérées. Par des expériences d'estérification méthylique des acides gras (FAME), nous avons montré que les membranes de PAOPX exhibent des profils d'AG différents en termes de C16, C16 :1 trans, C16 :1 cis, C17-cyclo et C19-cyclo, comparativement à H103 (**Figure 41B**). Globalement, une réduction du ratio trans/cis a été observé chez PAOPX, ce qui peut contribuer à l'augmentation de la rigidité membranaire. L'ensemble de ces données démontre que les structures des membranes sont fortement altérées en phase stationnaire de croissance chez PAOPX, et suggère que CmpX serait impliqué dans la morphologie cellulaire et le métabolisme membranaire.

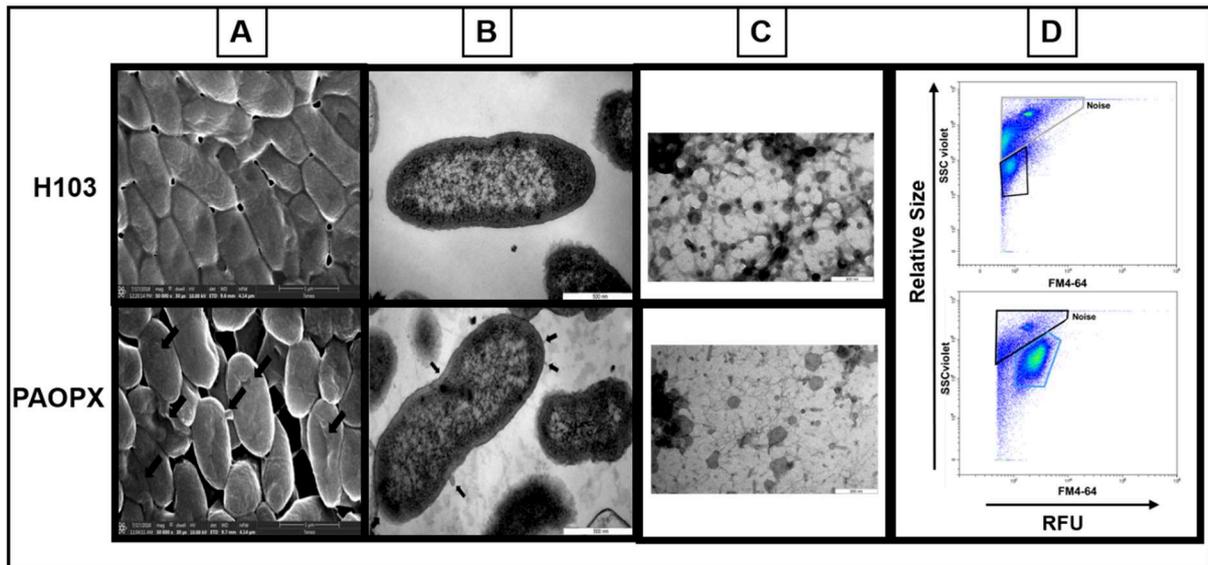


Figure 42. CmpX contribue à l'intégrité de l'enveloppe et la structure des vésicules de membrane externe.

A. Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de H103 et PAOPX, cultivés pendant 24h à 37°C en LB171. B. Images de microscopie électronique à transmission (MET) de H103 et PAOPX, cultivés pendant 24h à 37°C en LB171. C. Images de MET des vésicules de membrane externe extraites à partir des surnageants de H103 et PAOPX. D. Cytogrammes des vésicules extraites de H103 et PAOPX, obtenus par cytométrie en flux.

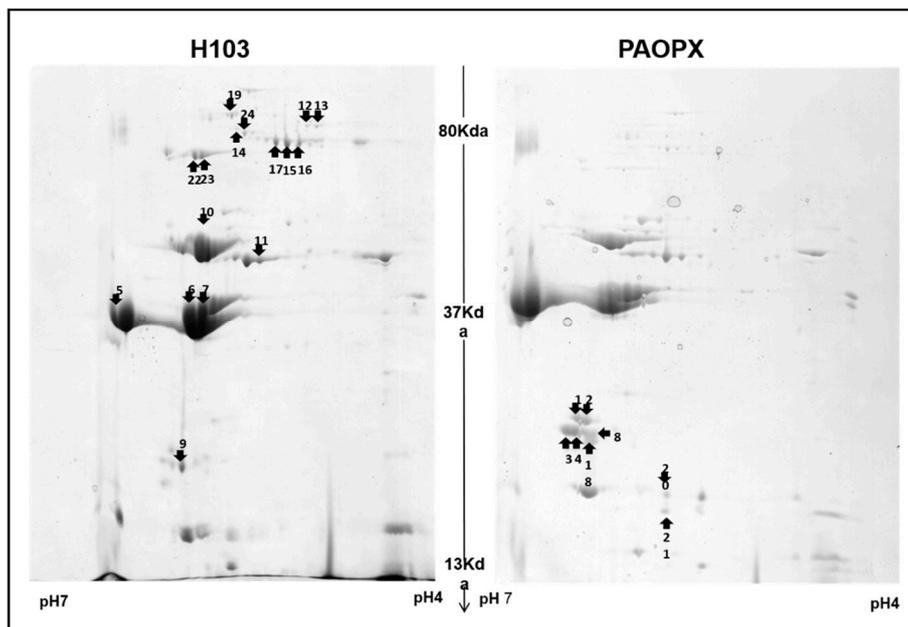


Figure 43. PAOPX montre une composition protéique de membrane externe altérée comparé à H103.

Images représentatives de gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines de membrane externe extraites de H103 et PAOPX, par utilisation de bandelettes de pH 4-7. Les nombres correspondent aux spots et protéines identifiées, qui sont décrites dans le texte.

iii. L'absence de CmpX altère la forme cellulaire et la production de vésicules de membrane externe.

Pour évaluer les altérations membranaires au niveau de l'enveloppe, une approche par microscopie a été utilisée en collaboration avec l'UMR6267 de l'Université de Poitiers. H103 et PAOPX ont été cultivées en phase stationnaire de croissance et visualisées par microscopie électronique à balayage (MEB, **Figure 42A**) ou à transmission (MET, **Figure 42B**). Comparativement aux cellules de H103, les cellules de PAOPX sont plus ovoïdes, présentent moins de surfaces de contact intercellulaire et des déformations latérales de taille et de profondeur qui semblent variables (**Figure 42A**). De manière plus résolutive, en MET, PAOPX présente des altérations de l'enveloppe au niveau d'au moins un des pôles de la cellule et des protubérances qui pourraient être des vésicules de membrane externe en formation (**Figure 42B**, flèches). Ces résultats confortent l'implication de CmpX dans l'homéostasie de l'enveloppe chez *P. aeruginosa* dans ces conditions de croissance. Pour confirmer ces observations, les vésicules ont été extraites des surnageants de H103 et PAOPX en phase stationnaire de croissance, observées par MET et analysées par cytomètre de flux après marquage des membranes par le fluorophore FM4-64. Des photographies de MET et des cytogrammes représentatifs sont présentés en **Figures 42C** et **42D**. Les vésicules extraites des surnageants de PAOPX apparaissent plus larges et moins sphériques comparées à celles extraites des surnageants de H103 (**Figure 42C**). Les cytogrammes confirment ces données (**Figure 42D**), puisque les vésicules de PAOPX présentent une intensité de fluorescence de $3 \cdot 10^3$ et une taille comprise entre 100 et 400 nm, alors que les vésicules de H103 présentent une intensité de fluorescence et une taille inférieure à 10^3 et 100 nm, respectivement (**Figure 42D**). Ces résultats suggèrent une implication de CmpX dans la formation des vésicules de membrane externe.

iv. La composition protéique de la membrane externe est altérée chez PAOPX.

Des électrophorèses bi-dimensionnelles ont été réalisées afin de comparer les profils protéiques de membrane externe de H103 et PAOPX. Environ 35 spots protéiques ont été visualisés de manière reproductible sur les gels correspondants à la souche H103, et 16 sur ceux de PAOPX. Un gel représentatif de chaque condition est montré en **Figure 43**. De manière générale, nous observons chez PAOPX une plus faible abondance des protéines de haut poids moléculaire (>70 kDa), et une apparition de spots de faible poids moléculaire (par exemple, spots 1-2-3-4-17-18). Après inspection visuelle des gels, 46 spots présentant de manière reproductible une variation d'intensité ou présents dans l'une ou l'autre des conditions, ont été considérés. Onze protéines appartenant à 5 classes fonctionnelles (récepteurs du fer, porines, modification du

Functional classification	PA number	Spot number	Gene name	Product or putative fonction	H103	PAOPX	Relative abundance in PAOPX /H103
General/aspecific porin	PA1777	1 & 2	<i>oprF</i>	Major outer membrane protein OprF			+
		3 & 4					+
		5-7					-
		8					+
Substrate-selective porin	PA4067	9	<i>oprG</i>	Outer membrane protein OprG			-
	PA0958	10	<i>oprD</i>	Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD			-
		11					-
Gated channels involved in iron homeostasis	PA4710	12 & 13	<i>phuR</i>	Hemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR			-
	PA2398	14 & 15	<i>fpvA</i>	Ferripyoverdine receptor FpvA			-
	PA4221	16	<i>fptA</i>	Fe(III)-pyochelin outer membrane receptor FpvA			-
LPS modification	PA4661	17	<i>pagL</i>	Lipid A 3-O-deacylase PagL			+
	PA0595	18	<i>lptD</i>	LPS-assembly protein LptD			-
Peptidoglycan protein	PA0973	19 & 20	<i>oprL</i>	Peptidoglycan associated lipoprotein OprL			+
Hypothetical protein	PA3923	21 & 22	/	Hypothetical protein			-
	PA4897	23	/	Hypothetical protein			-

Tableau 5. Liste de protéines de membrane externe identifiées de façon différentielle entre la souche PAOPX et H103.

LPS, lipoprotéines, et protéines hypothétiques), ont pu être identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou en tandem quand nécessaire (**Tableau 5**). Ainsi, FpvA et FptA, récepteurs de la ferripyoverdine, et de la ferripyocheline respectivement (spots 14-15, 16) voient leur abondance diminuer chez PAOPX, alors que PhuR, récepteur de l'hémoglobine (spots 12-13), existe sous au moins 2 isoformes chez H103 mais pas chez PAOPX. Ces données suggèrent que le mutant PAOPX pourrait être affecté dans la perception et/ou le transport du fer. Des protéines impliquées dans la modification du lipopolysaccharide (LPS) ont également été identifiées : PagL, une lipide A 3-O déacylase, (spot 17) apparaît chez PAOPX, et LptD, une protéine d'assemblage du LPS, (spot 18) diminue chez le mutant, suggérant que le LPS pourrait être moins abondant ou modifié chez PAOPX. La lipoprotéine structurale OprL (spots 19-20) a été détectée uniquement chez PAOPX, alors que 2 protéines hypothétiques (spot 21-22, 23) disparaissent chez PAOPX. Enfin des porines ont été identifiées : les porines spécifiques OprG et OprD (spots 9-10, 11) dont l'abondance est réduite chez PAOPX, et la porine majeure OprF identifiée au niveau des spots 5 à 7 (isoformes) dont l'abondance est plus faible chez le mutant ΔcmpX , ainsi qu'au niveau des spots 1-2-3-4 et 8, de masse moléculaire plus faible que celle d'OprF (<37 kDa), qui au contraire apparaissent chez PAOPX. De manière remarquable, nous avons pu localiser ces fragments sur la base de leur séquence dans la partie C-terminale de la protéine, correspondant au domaine périplasmique d'ancrage au peptidoglycane, ce qui suggère une dégradation de celle-ci (**Figure 44A**). Puisque la perte d'OprF a été précédemment montrée comme provoquant une réponse au stress d'enveloppe chez *P. aeruginosa* (**Bouffartigues et al., 2015**), nous avons suspecté que la réponse au stress d'enveloppe chez PAOPX pouvait également être activée. L'expression et l'activité des deux facteurs σ ECF de réponse au stress d'enveloppe AlgU et SigX ont été mesurées par RT-qPCR sur les gènes *algU* et *sigX*, ainsi que certaines de leurs cibles. Comme montré en **Figure 44B**, l'expression et l'activité de SigX, mais pas d'AlgU, sont fortement augmentées chez PAOPX, comparé à H103. L'ensemble de ces données démontre l'implication de CmpX dans l'homéostasie de la membrane externe.

v. **La mobilité de type « swarming » et la production des rhamnolipides sont altérées chez PAOPX.**

La production des rhamnolipides étant altérée chez un mutant ΔoprF (**Bouffartigues et al., 2011**) nous avons étudié la mobilité de type « swarming », un phénotype lié aux rhamnolipides, et évalué la production des rhamnolipides chez les souches PAOPX et H103. Comme montré dans la **Figure 45A**, PAOPX est affecté dans la mobilité de type « swarming », suggérant que PAOPX produit moins de surfactants. Ces données ont été confirmées par le test de la goutte

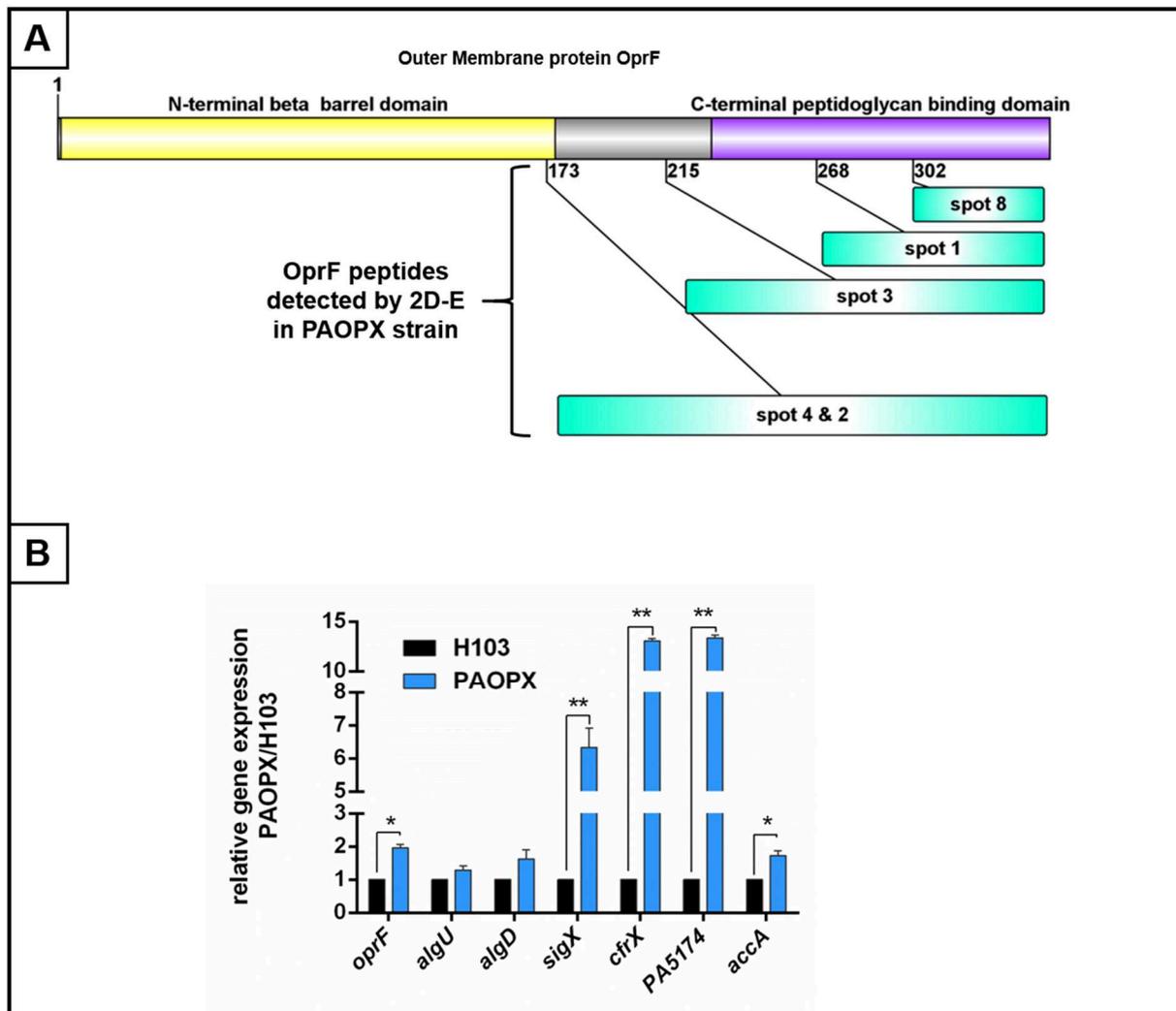


Figure 44. La porine majoritaire OprF est moins abondante et pourrait être dégradée chez PAOPX.

A. Représentation schématique des peptides d'OprF détectés chez la souche PAOPX après séparation par électrophorèse bidimensionnelle et identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. B. Expression relative des transcrits *oprF*, *algU*, *algD*, *sigX*, *cfrX*, PA5174 et *accA* dans les souches H103 et PAOPX, déterminée par RT-qPCR.

(**Figure 45B**). Puisque les rhamnolipides sont les surfactants majoritaires de *P. aeruginosa*, leur quantité a été mesurée à l'aide d'un dosage basé sur la technique du bleu de méthylène, confirmant ainsi un niveau de production significativement réduit dans les surnageant de cultures (**Figure 45C**). Le taux de transcrits *rhlA* étant trop faible dans la souche PAOPX, sa quantité relative a été mesurée par PCR digitale. L'expression de *rhlA* est réduite chez la souche PAOPX comparé à H103 (**Figure 45D**). Puisque la voie Rhl du QS régule l'expression de *rhlA*, la transcription des gènes *rhlI* et *rhlR* a été évaluée par RT-qPCR, et aucune différence significative n'a été observée (**Figure 45E**), suggérant que la production de molécule du QS pourrait ne pas être altérée chez la souche PAOPX. Cependant, la faible expression de *lecA*, une autre cible du système du QS Rhl, laisse suggérer que le système Rhl pourrait être affecté dans sa fonctionnalité. Puisque la souche PAOPX est fortement altérée dans la composition et la fluidité de ses membranes, l'ensemble de nos données suggère que le système Rhl pourrait être affecté en termes d'export (diffusion) au travers des membranes des molécules de communication de type C₄-HSL du système QS Rhl.

b. Discussion

S'il a été montré que le gène *cmpX* est régulé par le facteur σ ECF SigX, son rôle, et plus généralement celui de cette famille de protéines chez *P. aeruginosa*, reste largement méconnu. De manière intéressante, il a été observé chez le mutant $\Delta cmpX$ une activation de l'expression et de l'activité de SigX, des altérations de la composition lipidique des membranes en phase stationnaire et une diminution de la production des rhamnolipides, des phénotypes déjà observés chez un mutant $\Delta oprF$ (**Bouffartigues et al., 2015, 2011**). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que CmpX pourrait jouer un rôle clef dans l'intégrité de l'enveloppe, à ce stade de la croissance. En cohérence avec le rôle connu de MscS chez *E. coli* (**Levina et al., 1999**), nous avons observé que l'absence de CmpX chez *P. aeruginosa* provoque une réduction importante de la viabilité cellulaire lorsque la bactérie est cultivée au préalable en milieu hyper-osmotique. Ce résultat conforte sa fonction de canal ionique mécanosensible prédite et son implication dans la régulation de la pression de turgescence. Les basses températures étant connues pour favoriser les interactions entre chaînes d'AG et stabiliser les membranes, ces résultats suggèrent que cette souche pourrait présenter des structures membranaires plus rigides, comme nous l'avons montré par anisotropie de fluorescence avec les sondes TMA-DPH et DPH. Cependant, une certaine sensibilité de la souche PAOPX exposée à 50°C pendant 30 min a été observée, montrant que certaines zones membranaires pourraient être plus fluides chez ce mutant. Ces résultats pourraient être en accord avec l'augmentation de la fluidité mesurée au

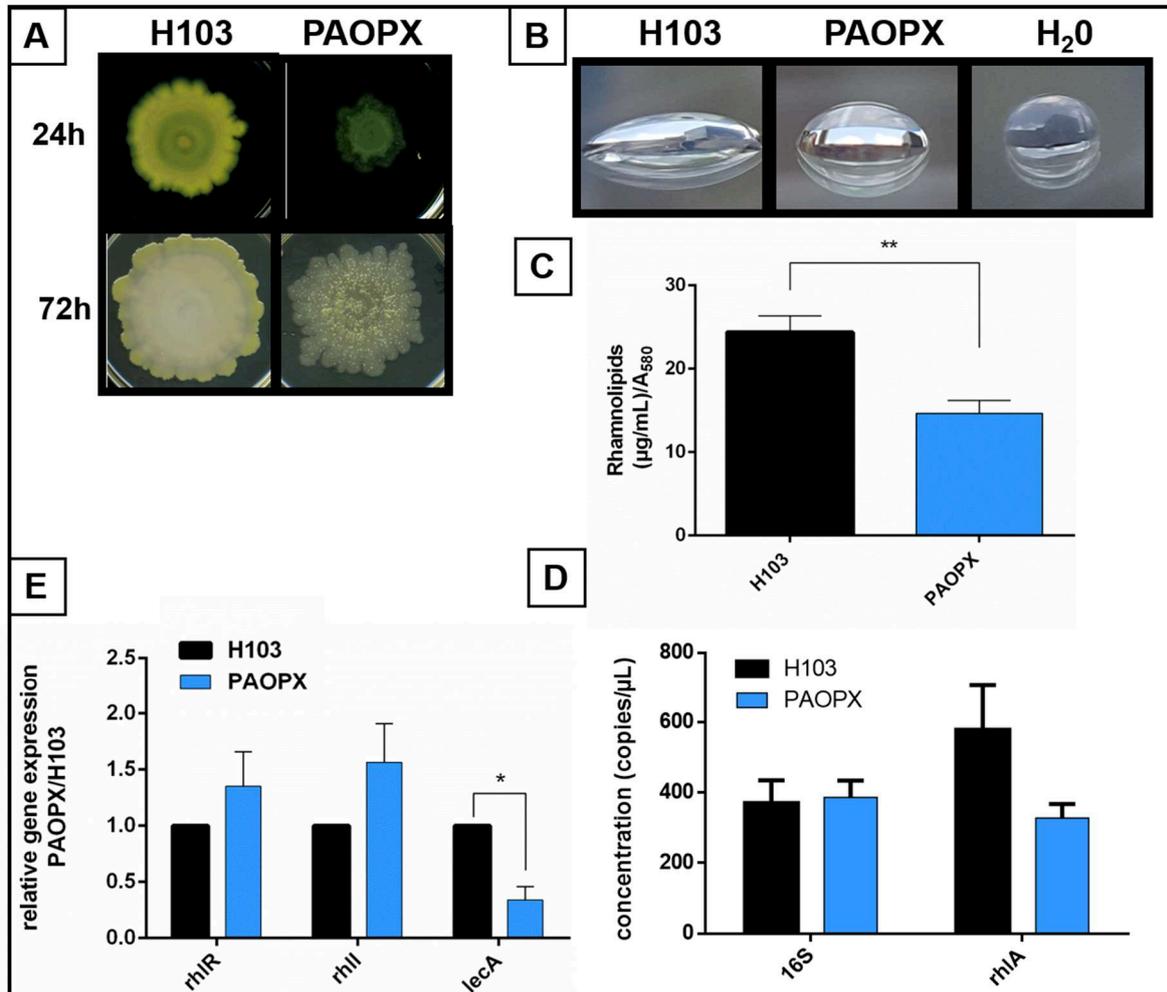


Figure 45. La mobilité de type « swarming » et la production des rhamnolipides sont altérées chez la souche PAOPX.

A. Mobilité de type swarming des souches H103 et PAOPX après 24h et 72h de croissance. B. Test de la goutte, avec le surnageant de cultures des souches H103 et PAOPX ou de l'eau (H₂O, témoin). C. Quantification en rhamnolipides des surnageant de cultures de H103 et PAOPX, par la méthode de dosage au bleu de méthylène. D. Quantification des transcrits 16S et *rhlA* des souches H103 et PAOPX par PCR digitale. E. Expression relative de *rhlR*, *rhlI* et *lecA* dans les souches H103 et PAOPX, mesurée par RT-qPCR.

niveau des squelettes glycérol des phospholipides avec la sonde Laurdan, ainsi qu'avec la désorganisation de l'enveloppe observée aux pôles chez PAOPX par MEB et MET. De manière hypothétique, cette augmentation de fluidité membranaire au niveau des squelettes glycérol, et de la rigidité au niveau des chaînes d'AG, pourrait refléter l'existence de zones courbes dans les membranes, comprimant le cœur hydrophobe et désorganisant la surface. De manière intéressante, il a été postulé que de telles structures courbes pourraient être impliquées dans la formation de vésicules de membrane externe (**Schwechheimer et al., 2014; Schwechheimer et Kuehn, 2015**). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une augmentation de la taille des vésicules chez PAOPX par rapport à celles produites par la souche H103, et une réduction de l'abondance d'OprF dont l'inactivation a été montrée pour augmenter la production de vésicules (**Wessel et al., 2013**). Nous observons également une diminution importante de l'abondance de protéines de haut poids moléculaire dans la membrane externe chez un mutant $\Delta cmpX$, suggérant que leur insertion dans la membrane et/ou leur transport pourrait être impactée, possiblement en raison de la rigidité du cœur hydrophobe. De plus, nous avons observé chez PAOPX l'apparition de PagL, une lipide A 3-O- déacylase, tout comme chez un mutant $\Delta sigX$ (**Duchesne et al., 2013**), qui a été montré pour avoir des membranes rigides. De manière intéressante, cette protéine a déjà été décrite chez *Salmonella enterica* Typhimurium comme pouvant altérer la production de vésicules (**Elhenawy et al., 2016**). L'ensemble de ces données montre que CmpX est un acteur majeur de l'homéostasie membranaire.

4. Conclusion

Ces travaux ont permis, par l'utilisation de stress thermiques, de décrypter une partie des mécanismes de régulation liant les membres de l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* aux facteurs σ ECF de réponse aux stress d'enveloppe AlgU et SigX. De plus, ces travaux ont permis de confirmer le rôle de CmpX en tant que canal mécanosensible, et de décrire l'impact d'un mutant $\Delta cmpX$ au niveau de l'homéostasie de l'enveloppe et de la physiologie de *P. aeruginosa*.

Discussion

L'enveloppe bactérienne est une structure complexe et très importante, du fait de son rôle de barrière et de lieu d'échanges entre le cytoplasme et l'environnement. Lorsque la bactérie est soumise à des changements environnementaux mettant en péril l'intégrité de l'enveloppe, elle est capable de s'adapter à ces changements par l'activation de nombreuses voies de réponses. L'activation des facteurs σ ECF AlgU et SigX sont deux voies majeures de réponse aux stress d'enveloppe chez cette bactérie. Si les conditions d'activation de ces deux facteurs σ ECF commencent à être bien décrites, il semble nécessaire dans un premier temps, d'en trouver de nouvelles pour tenter de découvrir le signal qui active SigX en particulier, et dans un deuxième temps, d'étudier la régulation au sens large de ces facteurs σ ECF. En effet, l'activation de ces facteurs σ ECF entraînant des effets physiologiques majeurs au niveau de la virulence ou de la formation de biofilm, il est nécessaire de comprendre ces mécanismes afin d'avoir la possibilité de les contrer dans un but thérapeutique (Chevalier et al., 2018).

SigX ayant été découvert et étudié il y a relativement peu de temps, par comparaison avec AlgU, notre groupe de travail s'intéresse à décrypter les mécanismes de régulation et les fonctions de ce facteur σ ECF. Ces travaux font suite aux travaux de thèse de Gwendoline Gicquel et Rachel Duchesne, qui ont porté sur l'étude du régulon de SigX, son rôle dans l'homéostasie de la membrane externe, du métabolisme et de la physiologie de la bactérie, et des liens régulationnels unissant SigX et OprF. Au vu du contexte génomique atypique de *sigX*, des soupçons quant à l'implication de *cfrX* et *cmpX* dans la régulation de *sigX* ont été formulés (Chevalier et al., 2018). Leur implication dans un potentiel nouveau système de transduction du signal, impliquant un canal mécanosenseur et le couple facteur anti-sigma-facteur sigma reste à démontrer, d'un point de vue fonctionnel.

Dans ce contexte, mes objectifs de thèse étaient de trouver de nouveaux régulateurs transcriptionnels et de nouvelles conditions régulatrices de SigX, et de préciser les fonctions cellulaires de CfrX et CmpX, ainsi que les interactions fonctionnelles entre les membres du système SigX-CfrX-CmpX.

1. Une souche énigmatique surproduisant des phages Pf4

Afin d'identifier sans à priori de nouveaux régulateurs transcriptionnels de *sigX* ou de nouvelles conditions menant à une modification de son expression, nous avons choisi de constituer une banque de mutants aléatoires à partir d'une souche rapportant l'activité de la région promotrice de *sigX*. Dans ce but, une stratégie basée sur des mutations par transposition a été choisie, présentant plusieurs avantages à savoir : i) l'obtention aisée de plusieurs milliers de clones qui ne seront majoritairement affectés que dans un seul gène ou clusters de gènes du fait de la faible fréquence de transposition (de l'ordre de 10^{-7}), ii) une faible létalité du traitement mutagène, comparativement aux UVs, par exemple, et iii) la capacité théorique de détecter « facilement » le site d'insertion du transposon, par des techniques de PCR semi-aléatoire ou de PCR inverse (Picardeau, 2010). De nombreux transposons existent dans la littérature, parmi lesquels les transposons de type *mariner* sont parmi les plus utilisés chez *P. aeruginosa* (Withers et al., 2014). Le transposon Mini-*Himar1* est un transposon qui a été délété du gène codant sa transposase, devenant ainsi non autonome et nécessitant l'apport d'une transposase en *trans* (Munoz-Lopez et Garcia-Perez, 2010). Il présente plusieurs avantages, justifiant son utilisation courante chez *P. aeruginosa*. Il est par exemple capable de transposer dans les dinucléotides TA, sans avoir de site préférentiel d'insertion. Le génome de *P. aeruginosa* contient 66% de GC (Stover et al., 2000) ; ce transposon permet donc théoriquement l'obtention d'une banque de mutants relativement peu redondante au niveau de chaque gène, avec environ 94 400 sites d'insertion potentiels dans l'ensemble du génome de *P. aeruginosa* PAO1 (Withers et al., 2014). Un autre avantage concerne sa capacité à transposer sans dépendre des facteurs de l'hôte, ce qui sous-entend la non-nécessité de stresser l'hôte pour que la transposition s'effectue (Lampe et al., 1999). Le plasmide pBT20 a été spécialement construit et optimisé dans ce but, et pour être utilisé chez *P. aeruginosa* (Kulasekara, 2014; Kulasekara et al., 2005). En effet, il porte d'un côté le transposon, et d'un autre côté la transposase, dont le gène a été muté pour augmenter son activité de transposition d'un facteur 50 (Lampe et al., 1999). Ce vecteur est de plus, suicide chez *P. aeruginosa*, permettant l'utilisation d'un seul plasmide pour effectuer la transposition, qui sera théoriquement rapidement éliminé de la cellule (Kulasekara, 2014).

Plusieurs techniques de PCR ont été décrites afin d'identifier les mutants d'intérêt. La PCR inverse par exemple, est une technique basée sur l'utilisation d'une enzyme de restriction, dont les produits sont à bouts francs, et dont on s'assure qu'elle coupe une fois au sein du transposon.

Après une auto-ligature, des amorces divergentes de chaque côté du transposon sont utilisées pour amplifier le gène d'intérêt (**Picardeau, 2010**). Une autre technique est la PCR semi-aléatoire, basée sur le principe de la PCR nichée. C'est cette dernière qui a été choisie pour ce travail, le protocole ayant déjà été décrit et utilisé chez *P. aeruginosa* (**Kulasekara, 2014**). Cependant, au vu des difficultés rencontrées, il serait intéressant d'utiliser et de mettre au point une autre technique d'identification, telle que la PCR inverse. Cela permettrait l'utilisation de l'une ou de l'autre technique en fonctions des difficultés rencontrées.

Une étape cruciale lors de la construction d'une banque de mutants par transposition est le crible utilisé, qui doit être aisément mis en œuvre pour permettre de distinguer les quelques 9400 clones, recouvrant théoriquement près de 2 fois l'ensemble du génome de *P. aeruginosa*. Les phénotypes observés dans un mutant *sigX* (biofilm, mobilité, ou production de facteurs de virulence) sont multifactoriels, et probablement plus liés à l'activité du facteur σ qu'à sa propre expression : ils ne peuvent donc être utilisés comme crible. La stratégie mise en œuvre a donc consisté en la construction d'une fusion transcriptionnelle entre la région promotrice de 686 pb localisée en amont de *sigX* et la cassette *luxCDABE*, au sein du plasmide Mini-CTX-Lux (**Hoang et al., 2000**). Cette cassette présente l'avantage de produire d'une part la luciférase, l'enzyme permettant la production de lumière (*luxAB*), et d'autre part les enzymes permettant la synthèse du substrat de la luciférase (*luxCDE*) (**Meighen, 1993**). Cette construction permet de suivre l'activité de la région promotrice de *sigX* au cours de la croissance de la souche témoin et des mutants, et donc d'identifier des différences de profils d'expression au cours de la croissance. Le gène *sigX* étant majoritairement exprimé en fin de phase exponentielle - début de phase stationnaire de croissance dans nos conditions, la mutation d'un gène entraînant la modification du profil sera identifiable par cette technique. De plus, les outils permettant ce criblage étaient disponibles au laboratoire. Cette construction a été insérée dans le chromosome de *P. aeruginosa* H103, afin de limiter le phénomène de dilution de l'activité des régulateurs qui pourrait avoir lieu en présence de plasmides multi-copies : la région promotrice naturelle étant conservée en amont de *sigX*, l'apport de cette région par un plasmide présent en plusieurs exemplaires augmenterait le phénomène de compétition entre la région promotrice naturelle de *sigX* et ces différentes régions apportées en *trans* utilisées pour le criblage des mutants.

Le criblage des mutants a cependant permis de constater certaines limites du rapporteur bioluminescent. En effet, ce système nécessitant beaucoup d'oxygène et de co-facteurs (**Meighen, 1993**), de nombreux mutants de gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme énergétique ou l'acquisition d'oxygène de la bactérie modifient les profils de

bioluminescence, alors que l'expression de *sigX* n'est en réalité pas modifiée. Ces faux positifs, régulièrement retrouvés dans les systèmes rapporteurs basés sur l'émission de bioluminescence (**van Rossum et al., 2017**), provoquent pour la grande majorité d'entre eux, une diminution de l'émission de lumière, parfois couplés à une modification des profils de bioluminescence. Pour la suite du criblage, seuls les mutants présentant de fortes différences devraient être étudiés, notamment ceux dont la production de bioluminescence est plus élevée que le témoin. L'inconvénient sera que plusieurs vrais mutants de régulateurs transcriptionnels de *sigX* seront probablement ignorés. L'avantage est que cela permettrait un premier criblage rapide des 8500 mutants restants de la banque, en n'identifiant que les régulateurs (ou conditions régulatrices) probablement fortement impliqués dans la régulation de l'expression de *sigX*. Par ailleurs, lors du crible des 940 premiers mutants, à part le mutant dH103Pf4⁺, un autre mutant d'intérêt a été identifié, dont le gène impacté par le transposon reste cependant à préciser.

La souche dH103Pf4⁺ produit des phages Pf4, titrés à 24h de croissance aux environs de 4×10^{10} UFP.mL⁻¹. Cette production entraîne un léger impact sur la croissance de la souche, par comparaison avec dH103. La souche dH103Pf4⁺ présente une rigidité membranaire plus importante que dH103, et un stress d'enveloppe, médié par AlgU, et non par SigX. L'architecture du biofilm formé par la souche dH103Pf4⁺ est également modifiée, probablement à cause de modulations dans l'expression des gènes codant les exopolysaccharides. Les cellules en biofilm dynamique semblent très allongées, un phénotype qui pourrait être lié à la surexpression de *mreB* dont le produit est impliqué dans la morphologie cellulaire, et à AlgU, qui pourrait être impliqué dans la régulation de *mreB* au vu de l'existence d'un promoteur dont la séquence est proche de la séquence du site de fixation d'AlgU en amont de *mreB*. La morphologie cellulaire semble peu affectée en condition planctonique ou en biofilm statique, suggérant que l'action du flux pourrait être requis pour visualiser l'allongement cellulaire. Il est également à noter que SpoT, acteur de la réponse stringente, est activé dans nos conditions. L'adhésion de cette souche est diminuée, et la mobilité de type « twitching », complètement abolie, probablement en relation avec la présence des phages sur les pili de type IV. La voie Chp/Vfr semble d'ailleurs activée, suggérant une augmentation de la virulence aigüe de la souche via l'implication de Vfr dans la régulation du QS. Cependant, cette souche présente une dérégulation du QS, menant à une forte diminution de la virulence globale, pouvant être expliquée par la diminution de la production de facteurs de virulence, de la cytotoxicité et du swarming. L'expression de certains gènes impliqués dans ces phénotypes est diminuée, suggérant une régulation de ces phénotypes par la souche dH103Pf4⁺.

Collectivement, l'ensemble de ces données suggère des changements physiologiques profonds au sein de cette souche, notamment une inhibition des phénotypes liés à la virulence aigüe, même s'il pourrait y avoir activation de la voie Chp/Vfr, et une réponse au stress d'enveloppe médiée par AlgU. Cette réponse serait induite en réponse à la production des phages Pf4, afin de contrer les effets potentiellement négatifs engendrés par ce phénomène. En effet, il a été montré que le QS pouvait participer à la résistance à certains phages, chez *E. coli* (Høyland-Kroghsbo et al., 2013), comme chez *P. aeruginosa* (Glessner et al., 1999). De plus, l'homologue d'AlgU chez *Salmonella enterica* Typhimurium, RpoE, a été montré comme pouvant participer à la résistance à l'infection du phage P22 (Amar et al., 2018). Enfin, la rigidité membranaire observée chez cette souche pourrait être la conséquence de l'insertion massive des protéines du phage Pf4 au sein de la membrane, afin de permettre son excrétion (Fowler et al., 2016; Hay et Lithgow, 2019).

Seulement, le génotype de cette souche reste à préciser. En effet, le séquençage du génome a révélé des mutations au sein du gène PA0724, ainsi que la présence du transposon au sein du gène PA4722. De fait, laquelle de ces modifications génotypiques provoquent ces phénotypes ? Il convient de répondre à cette question afin de confirmer les données pour les valoriser sous la forme d'un article.

Ce sont ces dernières données qui nous ont poussés à travailler sur la réponse à une infection par les phages Pf4 produits par la souche dH103Pf4⁺, en attendant de corréler le génotype aux phénotypes chez cette souche.

2. Une infection exogène par le phage Pf4 active les réponses de type « SOS », « stress d'enveloppe » et peut-être la réponse aux « contraintes de cisaillement » chez *P. aeruginosa*

a. Réponse au stress d'enveloppe et réponse SOS

Un traitement par des phages superinfectifs Pf4 entraîne de profondes modifications du biofilm et de la morphologie cellulaire. Ces phages entraînent un stress d'enveloppe, dont la réponse est médiée par SigX et AlgU. Ces deux facteurs σ ECF peuvent être activés indépendamment l'un de l'autre, selon des conditions qui leurs sont propres (Blanka et al., 2014; Bouffartigues et al., 2014, 2012; Brinkman et al., 1999; Schnider-Keel et al., 2001; Schurr et al., 1995).

Cependant, quelques conditions ont été montrées comme pouvant activer en parallèle ces deux ECFs, telles que la microgravité (Crabbé et al., 2010), un traitement à la D-cyclosérine (Wood et Ohman, 2009) ou la perte d'OprF (Bouffartigues et al., 2015). Cependant, concernant la microgravité, l'étude de Crabbé et collaborateurs a été réalisée dans des conditions mimant la microgravité (Crabbé et al., 2010). Dans des conditions réelles de vol spatial, une étude transcriptomique et protéomique a révélé que l'expression de *sigX* est diminuée par deux, ainsi que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras (Crabbé et al., 2011) qui sont sous le contrôle de SigX (Boechat et al., 2013).

L'activation de ces deux facteurs σ ECF entraîne une profonde modification du biofilm, par deux grandes voies : la modification du taux de c-di-GMP, et la dérégulation des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides de la matrice du biofilm. Le taux de c-di-GMP est augmenté dans nos conditions, due à l'action d'au moins trois diguanylate cyclases : MucR, activée par AlgU via AlgR (Kong et al., 2015), et GcbA et PA1181, activées par SigX (Bouffartigues et al., 2015). Le c-di-GMP peut également intervenir dans la régulation de l'expression des opérons Pel et Psl, par liaison à FleQ (Mauders et Welch, 2017). AlgU régule directement *algD*, premier gène de l'opéron *alg* (Wozniak et Ohman, 1994). AmrZ est un régulateur transcriptionnel important de *P. aeruginosa*, régulant la mobilité de type swarming, la production des exopolysaccharides et le taux de c-di-GMP dans la cellule (Jones et al., 2014). De manière intéressante, l'expression d'*amrZ* est augmentée dans le cadre d'un traitement par les phages Pf4. L'expression des gènes *pelB* et *algD* est augmentée, alors que celle de *pslB* est diminuée, confirmant l'implication d'AmrZ dans la régulation de ces gènes dans nos conditions. AmrZ a été démontré comme appartenant au régulon d'AlgU (Tart et al., 2006), et pourrait donc être la conséquence de l'activation d'AlgU dans nos conditions. De façon intéressante, il a été montré qu'AmrZ pouvait se lier en amont de SigX chez *Pseudomonas fluorescens* (Martínez-Granero et al., 2014), laissant supposer une possible régulation de *sigX* par AmrZ, et, par extension, par AlgU. Cette perspective est intéressante, au vu de la complémentarité des réponses gouvernées par AlgU et SigX chez *P. aeruginosa*. Enfin, nos travaux ont démontré que SigX pouvait également réguler AmrZ, notamment en réponse à une exposition à un choc froid. En résumé, AlgU et SigX pourraient réguler l'expression d'*amrZ*, contrôlant ainsi la production des exopolysaccharides.

Il est connu que le mode de vie sessile contribue à améliorer la survie bactérienne en conditions environnementales hostiles ; les biofilms formés étant beaucoup résistants à la température, à la dessiccation, aux forces physiques comme le cisaillement, à la phagocytose, ou encore aux

traitements antibiotiques et antiseptiques (Jefferson, 2004). Cependant, chez les autres bacilles à Gram négatif, il ne semble pas exister de relation entre l'activation de la réponse au stress d'enveloppe et la formation de biofilm, excepté chez *E. coli* K12, où l'activation de la voie Cpx entraîne l'inhibition de l'expression des gènes curli, diminuant son adhésion (Dorel et al., 1999). Il semble donc que *P. aeruginosa* ait développé une réponse au stress d'enveloppe avec des caractéristiques particulières. Premièrement, la co-existence de deux facteurs σ ECF répondant aux stress d'enveloppe, qui peuvent être activés séparément ou de façon commune selon les conditions environnementales, indique une régulation et une adaptation très fine au stress perçu. Deuxièmement, il semble que ces deux facteurs σ ECF soient impliqués dans la transition entre mode de vie planctonique et sessile via deux voies de régulation différentes : AlgU par l'activation de l'expression de l'opéron *alg*, par l'activation d'*amrZ*, et par l'activation de l'expression de la diguanylate cyclase *mucR*; et SigX par l'activation de l'expression des diguanylates cyclases *gcbA* et PA1181, et des opérons *alg*, *pel* et *psl* via AmrZ.

Un certain nombre de phages filamenteux sont des phages tempérés, et peuvent donc s'intégrer sous la forme de prophage dans le génome de la bactérie infectée (Rakonjac, 2012). Des variants superinfectifs des prophages Cflt (*Xanthomonas campestris*) et Pf4 (*P. aeruginosa*) apparaissent spontanément dans certaines conditions physiologiques, c'est-à-dire la phase stationnaire tardive pour Cflt et une culture prolongée en biofilm pour le Pf4 (Kuo et al., 1987; Rakonjac, 2012; Rice et al., 2009). L'apparition de ces formes superinfectives est encore très mal comprise. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que l'apparition des formes superinfectives de Pf4 coïncidait avec une accumulation de mutations au sein du gène *pf4r* ou de sa région promotrice (McElroy et al., 2014). Ces mutations seraient le résultat de l'accumulation des ROS au sein du biofilm (Hui et al., 2014; Wei et al., 2012). Le gène *pf4r* code un élément régulateur permettant la répression de *xisF4*, une excisionase responsable de l'excision du prophage et de la production du Pf4 (Li et al., 2019). Lors de la mutation du gène *pf4r*, les Pf4 qui sont produits sont des variants superinfectifs. Il a été montré que l'apparition de ces mutations et de cette forme superinfective contribuait à la dispersion du biofilm, par lyse des bactéries présentes au centre des microcolonies (Webb et al., 2004, 2003). Si la cause et le rôle physiologique de l'apparition de la forme superinfective du Pf4 est donc connu, le mécanisme moléculaire reste à déterminer.

L'ajout de phages Pf4 superinfectifs exogène altère fortement la morphologie cellulaire, lors de la formation de biofilm en conditions dynamiques. Cette altération n'apparaît que pour les cellules exposées au flux, situées en dehors des microcolonies du biofilm. Contrairement à ce

qui était précédemment admis, la filamentation cellulaire n'est pas qu'un état représentatif de cellules en fin de vie. Il a été montré que pour plusieurs espèces bactériennes, comme *E. coli*, *Legionella pneumophila* ou *Salmonella enterica* Typhimurium, la filamentation permettait une meilleure survie face à des conditions rigoureuses (Justice et al., 2008). En effet, la phagocytose de longues cellules, souvent plus grandes que la cellule immunitaire en elle-même, est plus complexe et difficile qu'en conditions normales (Justice et al., 2008). De plus, les longues cellules présentent en leur sein plusieurs copies du chromosome bactérien, favorisant la mutagénèse et les échanges de gènes et permettant une augmentation de la survie en conditions de stress (Bos et al., 2015). Chez *E. coli* (Bos et al., 2015) ou *P. aeruginosa* (Zaborskyte et al., 2017), l'exposition à des doses sub-inhibitrices de ciprofloxacine enclenche la réponse SOS, engendrant la filamentation cellulaire. Le mécanisme de la réponse SOS est désormais bien décrit. En présence d'un taux anormalement élevé d'ADN simple brin dans la cellule, le répresseur LexA s'auto-clive sous l'action de RecA. La levée de la répression de LexA permet l'induction de son régulon comprenant, entre autres, *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrC* ou encore *sulA* (Michel, 2005). Nous avons montré dans nos travaux, que l'infection par des phages Pf4 superinfectifs permettait l'induction de la réponse SOS. Le génome du phage Pf4 étant simple brin, l'hypothèse est que l'infection par ces phages Pf4 entraîne une élévation du taux d'ADN simple brin dans la cellule, activant la réponse SOS.

L'activation de cette réponse SOS entraîne deux grands phénomènes dans nos conditions. Le premier effet est l'inhibition de la division cellulaire via la protéine SulA, qui empêche la polymérisation de FtsZ (Trusca et al., 1998) et pourrait en partie expliquer le phénomène de filamentation cellulaire observé dans nos conditions. Il est à noter que, comme pour la souche dH103Pf4⁺, la surexpression de *mreB* via l'activité d'AlgU pourrait aussi participer à ce phénotype de filamentation cellulaire. Le deuxième effet est que la réponse SOS entraîne l'activation des gènes codant les pyocines. Les pyocines sont des bactériocines entraînant la lyse de la cellule hôte (Ghequire et De Mot, 2014), ce qui pourrait être la raison de la lyse bactérienne observée dans nos conditions. Pour résumer, l'hypothèse de l'apparition de lyse bactérienne lors de l'émergence de la forme superinfective du Pf4 serait que l'augmentation du taux d'ADN simple brin dans la cellule activerait la réponse SOS et la production de pyocines responsables de la lyse cellulaire observée. La bactérie s'en servirait à son avantage lors de la dispersion d'un biofilm. La lyse cellulaire observée ne concerne pas l'ensemble de la population bactérienne, indiquant qu'il existe probablement un autre mécanisme de régulation restant à déterminer. Notamment, nos travaux montrent que l'expression de *pilA* et de *pilH* diminue dans

nos conditions, suggérant une diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules. Ce phénomène permettrait l'accroissement de la survie des cellules, en diminuant le nombre de pilus de type IV à la surface bactérienne, et, par extension, le nombre de récepteurs potentiels pour les phages Pf4.

b. Impact sur la virulence, la voie Chp/Vfr et contraintes de cisaillement

Nos travaux ont également montré une diminution de la virulence globale lors d'infection par les phages Pf4 superinfectifs chez le nématode *C. elegans*. Globalement, le QS est altéré dans des conditions d'infection par le phage Pf4. L'expression des gènes de biosynthèse et de régulation des PQS est diminuée, ainsi que l'expression de *rhlR*. Au niveau phénotypique, cela se traduit par une diminution des PQS et des HSL, qui peuvent être responsables de la diminution de l'expression des gènes sous la dépendance du QS, tel que *lasB*, *rhlA*, *phzA1* et *phzA2*. Cela conduit à une diminution de la pyocyanine et de l'activité élastase. Le dosage des rhamnolipides reste à déterminer, mais l'expression de *rhlA*, gène codant la première enzyme dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides, est diminuée dans des conditions d'infections par les phages Pf4. Il est donc possible que les rhamnolipides soient moins synthétisés. La diminution du QS semble lié à QscR. L'expression de ce gène est en effet augmentée en présence de phages, et QscR a été montré comme inhibant post-traductionnellement les systèmes Las et Rhl (**Fuqua, 2006**). Il est donc possible que la diminution des HSL observée soit le résultat de l'activité de QscR. Les systèmes Las et Rhl étant impliqués dans la régulation du système PQS, il est possible que leur dérégulation impacte la transcription des gènes de ce système et conduise à la diminution de la quantité des PQS dans le surnageant. De plus, la transcription de *phrS*, un petit ARN activateur de la traduction de *pqsR* (**Sonnleitner et al., 2011**) est diminuée, pouvant également contribuer à la diminution des PQS dans nos conditions. De plus, CzcR, un régulateur dont l'expression est activée par AlgR (**Kong et al., 2015**), est capable d'inhiber la transcription de *phzA1*. Ces deux voies de régulation conduisent à la diminution de la pyocyanine.

La diminution de la virulence due à l'infection par des phages filamenteux n'est pas une généralité. De nombreux cas indiquant la présence de facteurs de virulence directement sur le génome du phage ont été décrits (**Wagner et Waldor, 2002**). Un des exemples les plus connus concerne le phage CTX ϕ , infectant *V. cholerae*, qui porte les gènes codant pour la toxine cholérique (**Kim et al., 2017**). Cependant, dans d'autres cas, l'infection par un phage provoque une augmentation de la production des facteurs de virulence de la bactérie en elle-même. Chez

Ralstonia solanacearum, l'infection par le phage filamenteux Φ RSS1 conduit à une augmentation de la virulence, liée à une augmentation de l'expression de gènes codant des facteurs de virulence (Addy et al., 2012a). A l'inverse, chez la même bactérie, l'infection par le phage filamenteux Φ RSM3 conduit à une diminution de la virulence de la bactérie (Addy et al., 2012b). Dans ce dernier cas, c'est une diminution de l'expression des facteurs de virulence qui est en cause, de la même façon que dans nos conditions, mais dont le mécanisme moléculaire reste à préciser.

Dans la condition d'un traitement par les phages Pf4, l'expression d'*exsA* ainsi que celles de ses cibles, telles que *exoT* et *exoS*, est augmentée par comparaison avec la condition non-traitée, témoignant d'une augmentation de son activité. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'expression d'*exoS* est augmentée dans un mutant par transposition de la région intergénique PA0716-PA0717, correspondant à la région codant les gènes *xisF4* et *pf4r* (Zhu et al., 2016), suggérant une activation du prophage Pf4 (Li et al., 2019). Le SST3 peut être régulé par la voie mécanosensible Chp/Vfr. La perception de la surface induit une élévation du taux d'AMPc via les deux adénylates cyclases CyaA et CyaB, et une augmentation de l'activité de Vfr, qui régule le QS, certains facteurs de virulence, ou encore l'expression d'*exsA* (Beaussart et al., 2014; Brutinel et al., 2009; Fuchs et al., 2010; Fulcher et al., 2010; Inclan et al., 2016; Persat et al., 2015; West et al., 1994). Dans nos conditions, l'expression de *vfr* est diminuée dans la condition traitée. Il a été montré que l'expression de *vfr* pouvait être inhibée par AlgR (Jones et al., 2010). Ce dernier étant surexprimé dans nos conditions, il pourrait être responsable de la diminution de l'expression de *vfr*. Vfr est actif lorsque l'AMPc est fixé dessus. L'expression de *cyaA* et *cyaB*, les adénylates cyclases responsables de la synthèse d'AMPc, est augmentée lors de l'infection par les phages Pf4. Il est possible que cette augmentation soit liée à la fixation des phages Pf4 sur les pili de type IV, qui, comme pour la souche dH103Pf4⁺, deviendraient des leurres pour le système de mécanotransduction lié aux pili de type IV.

De manière intéressante, l'expression de *pilA* est diminuée et la mobilité de type « twitching » est abolie en présence des phages Pf4. L'expression de *pilA* a été montré comme étant régulé par l'abondance intracellulaire de PilA (Bertrand et al., 2010). Lors de la rétraction du pilus, la dépolymérisation de ce dernier entraîne une augmentation de PilA dans la membrane interne, qui interagit avec PilS et permet la diminution de l'expression de *pilA* (Kilmury et Burrows, 2016). Ces résultats seraient ainsi la conséquence de la liaison des phages Pf4 aux pili de type IV, entraînant leur rétraction et inhibant la mobilité de type « twitching ». De plus, il a été

montré qu'un mutant Δvfr entraîne une forte diminution de la mobilité de type « twitching » (**Beatson et al., 2002**), pouvant contribuer à ce phénotype observé dans nos conditions.

Si le taux d'AMPC n'a pas été dosé, celui du c-di-GMP est, en revanche, augmenté dans cette condition. Chez *P. aeruginosa*, ces deux messagers secondaires intracellulaires présentent des relations inverses (**Almblad et al., 2015**). Il est donc possible que ce taux soit abaissé dans nos conditions, malgré l'augmentation de l'expression de *cyaA* et *cyaB*. Il a été montré que l'abaissement du taux d'AMPC dû à l'augmentation du taux de c-di-GMP n'était pas lié à l'expression ou à l'activité des adénylates cyclases CyaA et CyaB, mais par un mécanisme restant à déterminer (**Almblad et al., 2015**). Il est donc possible que le taux d'AMPC soit diminué dans cette condition, malgré une augmentation de l'expression de *cyaA* et *cyaB*. Le dosage de l'AMPC en réponse à une infection phagique permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. L'expression du gène *vfr* étant diminué, il est possible que l'augmentation de l'expression d'*exsA* soit le fait d'une autre voie de régulation.

RsmA, par exemple, a été décrit comme pouvant réguler positivement le SST3 (**Mulcahy et al., 2006**). RsmA est régulé par la voie Gac/Rsm. GacS est un senseur, phosphorylant GacA par un stimulus inconnu. GacA phosphorylé peut alors activer l'expression de *rsmY* et *rsmZ*, les deux petits ARNs non codant séquestrant RsmA, empêchant ainsi son activité de régulateur post-transcriptionnel. Il est connu que RetS, un autre senseur, peut inhiber GacS en présence de débris cellulaires provenant d'autres cellules de *P. aeruginosa* (**LeRoux et al., 2015**). Nous avons observé une lyse partielle dans nos conditions, probablement due à l'activation des pyocines via la réponse SOS. Il est possible que RetS soit activé par ces débris cellulaires, conduisant à la diminution de l'expression de *rsmY* et *rsmZ* et de fait, à l'augmentation de RsmA « libre », pouvant réguler la production d'ExsA. Il a également été montré que la réponse SOS pouvait directement agir sur le SST3, puisque l'inactivation de PrtR lors de l'induction de la réponse SOS empêche l'inhibition de l'expression de *ptrB*, codant un répresseur d'*exsA* (**Wu et Jin, 2005**). D'autres voies de régulation de l'expression ou de l'activité d'ExsA ont été explorées, comme PsrA, Fis, ou encore PA0161. L'ensemble de nos résultats révèle que la régulation au sens large d'ExsA est très complexe, avec probablement plusieurs niveaux de régulations interconnectés. Ainsi, il semble difficile d'attribuer l'augmentation de l'expression et de l'activité d'ExsA à un régulateur précis dans nos conditions.

Cependant, bien que l'activité d'ExsA soit augmentée, la cytotoxicité est diminuée sur cellules pulmonaires immortalisées A549. Ainsi, trois hypothèses peuvent être émises. La première serait que le SST3 soit non-fonctionnel. Il y aurait donc un découplage entre la transcription et

le phénotype, indiquant des régulations post-transcriptionnelles supplémentaires. La deuxième hypothèse serait que la diminution de la cytotoxicité soit liée à la diminution de l'expression de *lecA* (Chemani et al., 2009), et la diminution de la production des autres facteurs de virulence. Ainsi, la troisième hypothèse pourrait être que l'enveloppe, et notamment les membranes, présente des problèmes de fonctionnalité. L'infection par les phages Pf4, l'adressage massif de protéines phagiques dans les membranes (notamment interne) ou encore l'augmentation de la fluidité membranaire lié à SigX pourrait empêcher l'assemblage et/ou la fonctionnalité du SST3 au sein de l'enveloppe. Il est également possible que ce phénotype soit lié à l'addition de plusieurs de ces phénomènes. Dans tous les cas, ces résultats doivent être complétés par un dosage des exotoxines ExoS et ExoT, afin de conclure quant à l'activité du SST3 lors d'un traitement par les phages superinfectifs Pf4. Ce dosage devra être effectué en conditions stimulantes (déplétion en Ca^{2+} , par exemple), en extra et en intracellulaire pour déterminer au mieux l'hypothèse la plus probable.

Enfin, lorsque *P. aeruginosa* est adhérente, il a été montré que l'application d'un flux générant des contraintes de cisaillement pouvait être ressenti par les pili de type IV, et plus précisément par PilY1 (Rodesney et al., 2017). Cette mécanosensation provoque alors une augmentation du c-di-GMP (Rodesney et al., 2017). Il est possible que l'accrochage des phages aux pili de type IV entraîne une surface de résistance aux flux plus importante qu'en absence de phages, augmentant de fait les contraintes de cisaillement. Potentiellement, l'augmentation du taux de c-di-GMP provoquée par ce mécanisme pourrait diminuer celui de l'AMPC, de façon indépendante de l'expression ou de l'activité des adénylates cyclases CyaA et CyaB, comme décrit précédemment (Almblad et al., 2015). Il est donc nécessaire de réaliser le dosage de l'AMPC dans nos conditions, afin de préciser le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'infection par ces phages Pf4.

c. Comparaison des réponses entre la souche dH103Pf4⁺ et l'ajout exogène par les phages Pf4 superinfectifs

Il existe des réponses communes entre la souche dH103Pf4⁺ et l'infection exogène par les phages Pf4 superinfectifs. Dans l'ensemble, la modification de l'architecture du biofilm, l'augmentation de la taille des cellules, et les phénotypes de virulence sont très similaires. Les différences résident dans les réponses moléculaires. Tout d'abord, le stress d'enveloppe chez la souche dH103Pf4⁺ est médiée par AlgU uniquement ; alors qu'une infection par les phages Pf4 superinfectifs provoque l'activation d'AlgU et SigX. AmrZ et le c-di-GMP ne semble pas

modifié chez la souche dH103Pf4⁺, au contraire de la condition « infection ». Une différence majeure réside également dans la fluidité des membranes : la souche dH103Pf4⁺ présente une rigidité plus importante de ses membranes, alors que l'infection par les phages Pf4 superinfectifs provoque l'augmentation de la fluidité membranaire, probablement médiée par SigX. Ces deux conditions présentent également quelques différences au niveau de la voie Chp/Vfr, puisque l'expression de *pilA*, *pilH* et *vfr* est augmentée dans la souche dH103Pf4⁺, au contraire de la condition « infection ». Globalement, si l'on compare les réponses communes aux deux conditions, il semble que la souche dH103Pf4⁺ présente des réponses moins fortes que lors de l'infection par les phages Pf4 superinfectifs. L'expression des gènes présente des valeurs de fold-change moins importantes, suggérant une forme d'adaptation de la souche à la production des phages. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, la première des étapes sera de confirmer quel génotype (mutations dans le PA0724 ou le transposon dans le PA4722) est responsable des phénotypes observés. Si les phénotypes observés sont bien le résultat de la production des phages Pf4 superinfectifs, il sera intéressant d'étudier ces différences de réponse, d'un point de vue adaptation, en comparaison avec un traitement par des phages Pf4 superinfectifs. D'un autre côté, de nombreux phénotypes sont similaires entre les deux conditions, comme la modification de l'architecture du biofilm, la dérégulation du QS ou encore la diminution de la virulence globale. Ces résultats suggèrent qu'un certain nombre de phénotypes sont spécifiques de la réponse aux phages Pf4.

d. Comparaison de la réponse bactérienne entre le mutant $\Delta oprF$ et l'infection par les phages Pf4 superinfectifs

Il est intéressant de noter que la perte de la protéine OprF provoque l'activation des deux ECFs, AlgU et SigX, menant à une série de phénotypes similaires à ceux observés lors d'un traitement par les phages Pf4 superinfectifs (**Bouffartigues et al., 2015, 2011; Fito-Boncompte et al., 2011**). Au niveau du biofilm, le mutant $\Delta oprF$ présente une augmentation et une altération de l'architecture du biofilm, liées à l'augmentation du taux de c-di-GMP en partie due à l'augmentation de l'expression des diguanylate cyclases PA1181 et GcbA, et à la dérégulation des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides constitutifs de la matrice du biofilm (**Bouffartigues et al., 2015**). Au niveau de la virulence, il a été montré qu'un mutant $\Delta oprF$ était moins virulent, moins cytotoxique en lien avec une diminution de la lectine LecA, produisait moins de facteurs de virulence comme la pyocyanine, l'élastase, les rhamnolipides et était affecté dans la production des molécules du QS

(**Bouffartigues et al., 2011; Fito-Boncompagni et al., 2011**). L'ensemble de ces résultats est similaire à ceux obtenus lors d'un traitement par des phages Pf4, laissant supposer que l'activation des deux facteurs σ ECF de réponse au stress d'enveloppe conduit la bactérie à adopter une stratégie de protection visant à privilégier un mode de vie sessile plutôt qu'un mode de vie planctonique.

Néanmoins, des différences existent, au niveau phénotypique, entre le mutant *oprF* et le traitement par les phages superinfectifs Pf4. Tout d'abord, il a été noté que le SST3 était défaillant chez le mutant *oprF*, étant donné la diminution de la production des exotoxines telles que ExoT ou ExoS. Chez ce mutant, un plasmide surexprimant *exsA* suffit à rétablir l'activité du SST3 (**Fito-Boncompagni et al., 2011**). Nos conditions diffèrent, puisque l'expression et l'activité d'ExsA semblent être augmentées. Ce phénotype pourrait être lié à l'activation de la voie Chp/Vfr, en lien avec l'accrochage des phages aux pili de type IV. En lien, la mobilité de type « twitching » n'est pas modifiée chez un mutant Δ *oprF*, suggérant que son abolition dans les conditions d'infection soit liée aux phages Pf4. Au niveau du QS, le mutant Δ *oprF* montre une diminution de la production de 3-oxo-C₁₂-HSL, un retard de production de C₄-HSL, une diminution de la production de PQS et une accumulation de HHQ dans la cellule (**Fito-Boncompagni et al., 2011**). L'évaluation de la quantité des HSL et PQS dans nos conditions n'étant pas aussi précise que lors de cette étude, nous ne pouvons affirmer des mécanismes similaires. Nous ne pouvons qu'affirmer que la production des HSL et des PQS est diminuée dans nos conditions d'infections par les phages Pf4. Un dosage des différentes espèces de HSL, de HHQ et PQS sera à réaliser à l'avenir. La dernière différence majeure concerne l'activation de la voie SOS dans nos conditions d'infection phagique, et de ses phénotypes, tels que la filamentation cellulaire et l'activation de la production des pyocines.

e. Condition qui active fortement SigX : vers la découverte du signal activant SigX ?

Un des faits marquants dans ces travaux est la forte augmentation de l'expression et de l'activité de SigX. En effet, jusqu'alors, les conditions d'activation de SigX entraînaient une augmentation de son expression et de son activité plutôt modeste, d'environ 1,5 à 2,5 fois (**Blanka et al., 2014; Bouffartigues et al., 2015, 2014, 2012; Brinkman et al., 1999; Crabbé et al., 2010; Wood et Ohman, 2009**). Nos conditions montrent une augmentation de l'expression de *sigX* de 5,7 fois par rapport à la condition non-traitée, et une augmentation de l'expression de *cfrX*, *cmpX* et *fabY* d'environ 23,3, 28 et 5 fois, respectivement. Ces fortes

augmentations suggèrent que l'on se rapproche de la découverte du signal qui active SigX, toujours inconnu pour l'instant.

3. Vers la compréhension du système SigX–CfrX–CmpX

Nous avons démontré que la réponse moléculaire enclenchée par *P. aeruginosa* différait selon l'application de chocs froids ou chauds. Si la réponse au choc chaud est majoritairement gouvernée par AlgU et RpoH chez *P. aeruginosa*, la réponse au choc froid semble majoritairement gouvernée par SigX. Notamment, ces travaux ont permis de mettre en lumière, en fonction de variations de température, l'expression différentielle des gènes *cmaX-cfrX-cmpX* situé en amont de *sigX*. En d'autres termes, il a été montré qu'AlgU et SigX pouvaient réguler *cmaX* et *cfrX-cmpX*, respectivement. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études globales, où l'expression du gène *cmaX* était modifiée dans le cadre de conditions activant AlgU (Wood et Ohman, 2009) ou chez un mutant $\Delta algU$ (Schulz et al., 2015), et où l'expression des gènes *cfrX* et *cmpX* était modifiée dans le cadre d'un mutant $\Delta sigX$ (Blanka et al., 2014; Gicquel et al., 2013), confirmant leur co-transcription.

Aucun facteur anti-sigma n'a pour l'instant été décrit pour SigX. Cependant, en termes d'organisation génomique, les gènes codant les facteurs sigma et anti-sigma sont très souvent proches les uns des autres, et sont généralement co-transcrits (Helmann, 2002). L'environnement génomique particulier de *sigX*, avec *oprF* en aval, et trois gènes en amont codant des protéines inconnues, ne permet pas, de prime abord, l'identification formelle d'un gène codant un facteur anti-sigma. Le gène *cmaX* possède des domaines retrouvés chez les transporteurs de zinc et de magnésium (www.pseudomonas.com). Le gène *cmpX* possède un domaine qui est retrouvé dans ceux codant les canaux mécanosensibles (www.pseudomonas.com). Le gène *cfrX* ne possède pas de domaine particulier décrit (www.pseudomonas.com). En revanche, une étude a montré que, même si CfrX ne possédait pas le domaine ASD, spécifique des facteurs anti-sigma, cette protéine possédait une extension N-terminale pouvant jouer ce rôle (Staroń et al., 2009). Il est courant que les facteurs σ ECF régulent leurs propres gènes, ainsi que celui de leur facteur anti-sigma (Helmann, 2002; Schulz et al., 2015; Wood et Ohman, 2009). Ces données suggèrent que CfrX pourrait être le facteur anti-sigma de SigX et font l'objet d'une autre étude (Bouffartigues et al., en préparation). En revanche, le rôle de CmpX, puisque co-transcrit avec *cfrX*, reste à déterminer. Il a été montré que l'expression de *sigX* était diminuée dans un mutant $\Delta cmpX$ (Bhagirath et al., 2018). Nos travaux ont montré l'inverse : dans nos conditions, l'expression de *sigX* est augmentée dans un

mutant $\Delta cmpX$, ainsi que l'expression de *cfrX*, *oprF* et *fabY* (PA5174), des gènes appartenant au régulon de SigX, suggérant ainsi une augmentation de son activité. Cette différence de résultat par rapport à la littérature peut être expliquée par la méthode dont le mutant a été construit. Dans l'étude de Bhagirath, le gène entier a été délété (**Bhagirath et al., 2018**). Or, des données internes au laboratoire ont montré que *sigX* possède une large région promotrice, composée de plusieurs promoteurs, dont certains sont situés au sein du gène *cmpX*. Notamment, le promoteur situé à la fin du gène *cmpX* pourrait être responsable d'environ la moitié de l'activité promotrice de *sigX*. Ainsi, le mutant $\Delta cmpX$ que nous avons construit est seulement délété de la partie située en amont du premier promoteur putatif de *sigX*, situé vers le milieu du gène. Cette différence de construction pourrait expliquer la diminution de l'expression de *sigX* observée dans l'étude de Bhagirath (**Bhagirath et al., 2018**), et pourrait relever d'un biais dans l'étude. Ces résultats révèlent également que SigX est activé lorsque CmpX est absent dans la cellule, ce qui suggère une régulation de CmpX sur l'activité de SigX. De manière remarquable, les facteurs d'expression et d'activité de SigX dans un mutant *cmpX* sont également très élevés, d'un niveau proche de ceux observés dans le cadre d'une infection par le phage Pf4. Ces données suggèrent que le signal activant SigX pourrait être en lien avec ces deux conditions.

CmpX est prédit pour être un canal ionique mécanosensible. Nos travaux ont confirmé cette fonction, puisqu'un mutant $\Delta cmpX$ est beaucoup moins résistant à un choc osmotique. Ce mutant provoque également de nombreux changements au niveau de l'enveloppe, avec des cellules présentant une morphologie altérée et une production de vésicules de tailles plus importantes que celles de *P. aeruginosa* H103. De plus, ce mutant présente une rigidité membranaire des régions profondes plus importante que *P. aeruginosa* H103, corrélé avec une plus grande proportion d'AG à longues chaînes chez le mutant $\Delta cmpX$. Cependant, nous avons montré qu'en surface, au niveau des têtes hydrophiles de la bicouche lipidique, la fluidité est plus importante que dans *P. aeruginosa* H103, suggérant une désorganisation des lipides membranaires et une modification de la structure des membranes. Dans le mutant $\Delta cmpX$, une étude protéomique a également révélé qu'OprF semblait protéolysé en peptides. De manière intéressante, la production de rhamnolipides et de C₄-HSL est diminuée chez le mutant $\Delta cmpX$. Il est intéressant de noter que ces phénotypes sont similaires à ceux d'un mutant $\Delta oprF$, ou des résultats obtenus lors de l'infection par les phages Pf4 (**Bouffartigues et al., 2011**; **Fito-Boncompte et al., 2011**). Enfin, l'expression des gènes codant les enzymes impliquées la réponse stringente, telles que *relA* et *spoT*, est augmentée chez le mutant $\Delta cmpX$. La réponse stringente est généralement induite par la bactérie lors de stress tels que la carence en acides

aminés (Haseltine et Block, 1973) ou en fer (Vinella et al., 2005), ou encore lors de chocs chauds (Gallant et al., 1977). De plus, cette réponse peut être activée lors d'une limitation en AG, par l'action de SpoT (Battesti et Bouveret, 2009, 2006; Seyfzadeh et al., 1993). Cette dernière est une enzyme pouvant synthétiser ou dégrader le (p)ppGpp, selon les conditions de carence ou d'abondance d'AG, respectivement (Battesti et Bouveret, 2009, 2006). De plus, il a été récemment décrit que le (p)ppGpp était également impliqué dans la réponse au stress induit par un défaut de biogénèse de la membrane externe (Roghania et al., 2019). Ces données suggèrent l'implication de la réponse stringente dans la réponse au stress d'enveloppe, notamment membranaire. Le mutant $\Delta cmpX$ présente des altérations morphologiques et des perturbations au niveau de la structure de la membrane, mises en évidence par les modifications de la fluidité aux différentes épaisseurs de la membrane et les changements de proportions d'AG. Il est donc possible que ces perturbations membranaires induisent la réponse stringente chez ce mutant. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré qu'un double mutant $\Delta relA/\Delta spoT$ était moins virulent, notamment à cause de l'expression réduite du SST3, et de taux réduits de pyoverdine, de pyocyanine, d'alginate et de l'activité des élastases (Xu et al., 2016). L'activation de la réponse stringente chez *P. aeruginosa* entraîne l'expression de *rpoS* et l'activation précoce du QS, indépendamment de la densité cellulaire, et la production de facteurs de virulence tels que l'élastase B (van Delden et al., 2001). Les phénotypes observés chez le mutant $\Delta cmpX$ sont donc probablement indépendants de cette réponse. Les effets de cette réponse sur la physiologie du mutant $\Delta cmpX$ devront donc être précisés.

Ce canal mécanosensible est donc impliqué dans la physiologie membranaire et la morphologie bactérienne. La mutation de ce gène entraîne de fortes perturbations membranaires et conduit à l'activation de SigX. Ce facteur σ ECF est également activé en réponse à un choc froid, comme décrit précédemment, mais également en réponse à un traitement par la valinomycine, un agent antibactérien ciblant et rigidifiant les membranes (El Houry et al., 2017). Le froid est également connu pour rigidifier les membranes. L'ensemble de ces résultats suggère que SigX est un facteur σ ECF répondant aux conditions de stress membranaires, principalement en réponse à une rigidification des membranes. Ainsi, CmpX pourrait être le senseur de ces changements de tension membranaire, entraînant le relargage de SigX via un changement de conformation et/ou une protéolyse de CfrX, et permettant la régulation des gènes sous la dépendance de SigX.

Un point commun à la quasi-totalité de ces conditions est la diminution de l'expression des gènes codant les enzymes-clés de la voie de biosynthèse des rhamnolipides et/ou la diminution

de la production des rhamnolipides. De façon similaire, la production de rhamnolipides est altérée dans un mutant $\Delta oprF$ (Bouffartigues et al., 2011). Il a été montré que SigX était impliqué dans la régulation des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des AG (Figure 16 ; Boechat et al., 2013). Or, le précurseur de la biosynthèse des rhamnolipides est le β -hydroxyacyl-ACP, qui, sous l'action de RhlA, est modifié en acide β -hydroxyalcanoyl- β -hydroxyalcanoïque (Bahia et al., 2018). L'expression de *rhlA* est diminuée dans nos conditions, c'est-à-dire dans les conditions où SigX est activé. Cette observation pourrait donc être la conséquence de l'adaptation de la bactérie, où la voie de biosynthèse des AG serait privilégiée par rapport à celle des rhamnolipides. Cette hypothèse reste à démontrer.

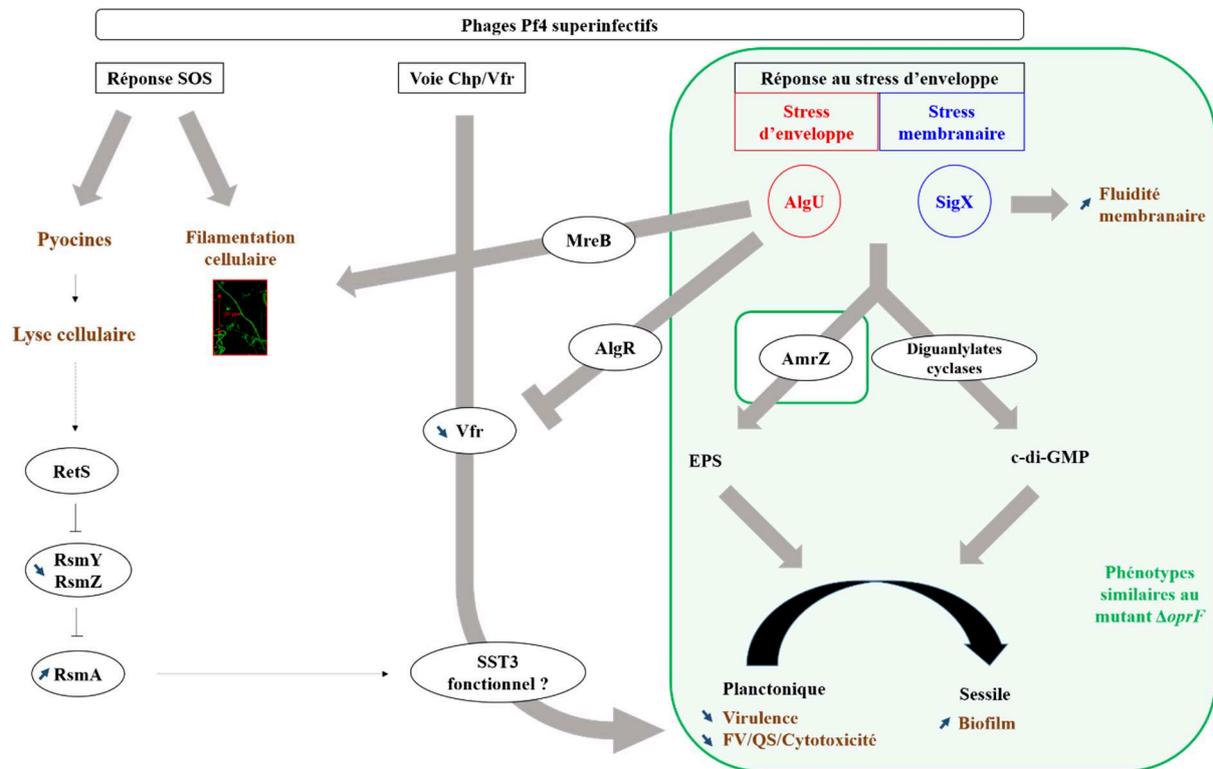


Figure 46. Schéma récapitulatif des travaux menés lors de l'infection de *P. aeruginosa* H103 par des phages Pf4 superinfectifs.

L'infection par des phages Pf4 superinfectifs provoque un stress d'enveloppe, médié par AlgU et SigX. Ces deux facteurs σ ECF sont impliqués dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile de la bactérie, par le biais de l'activation de gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS via AmrZ, et l'augmentation du taux de c-di-GMP, via l'activité de diguanylate cyclases. Ainsi, l'architecture du biofilm est modifiée, et la production de biofilm plus importante, alors que la virulence globale est diminuée, liée à la diminution de la production de facteurs de virulence (FV), du QS, ainsi que de la cytotoxicité. Ces phénotypes sont similaires à ceux observés chez un mutant $\Delta oprF$ (encadré vert). Egalement, ces phages activent la voie Chp/Vfr, excepté Vfr, dont l'expression est diminuée, probablement dû à AlgR. De futures expériences devront être menées pour caractériser la fonctionnalité du SST3. Enfin, la réponse SOS est également activée, menant à une filamentation cellulaire, qui peut également être le fait d'AlgU, via MreB, et à l'expression de pyocines, pouvant entraîner la lyse cellulaire. Cette lyse pourrait être perçue par RetS, qui permettrait au final d'augmenter le taux de RsmA libre dans la cellule.

Conclusion – Perspectives

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste présentant une grande capacité d'adaptation et de résistance, en partie grâce à son enveloppe très peu perméable. Cette dernière est une barrière très importante entre le cytoplasme et l'environnement, et son homéostasie doit donc être parfaitement contrôlée et finement régulée. De nombreux TCS et facteurs σ ECF participent à la régulation de l'homéostasie de l'enveloppe, notamment AlgU et SigX. SigX est activé lors de conditions amenant à une déstabilisation de l'enveloppe, telles que la présence de D-cyclosérine, la perte d'OprF, ou des conditions d'hypo-osmolarité, forte concentration en sucrose ou des conditions de microgravité (Bouffartigues et al., 2015, 2014, 2012; Brinkman et al., 1999; Crabbé et al., 2011; Wood et Ohman, 2009). En réponse, ce facteur σ ECF va réguler plus de 300 gènes, impliqués dans des grandes fonctions comme l'homéostasie membranaire, le biofilm, la virulence ou encore la résistance aux antibiotiques (Blanka et al., 2014; Boechat et al., 2013; Brinkman et al., 1999; Duchesne et al., 2013; Fléhard et al., 2018; Gicquel et al., 2013; Schulz et al., 2015). Peu de choses sont en revanche décrites concernant la régulation transcriptionnelle de *sigX*, excepté que ce facteur σ ECF est capable de s'auto-réguler.

La construction d'un outil moléculaire afin de découvrir de nouveaux régulateurs transcriptionnels et de nouvelles conditions régulatrices de *sigX* a donc été réalisé. La constitution de la banque de mutants par transposition a d'ores-et-déjà permis la découverte d'une nouvelle condition activatrice de *sigX*. Elle permettra à l'avenir d'isoler de nouveaux régulateurs. De fait, un nouveau mutant par transposition exhibant une forte augmentation de bioluminescence a été isolé, et sera caractérisé prochainement. Au vu des difficultés rencontrées lors de l'identification de l'emplacement du transposon, il sera peut-être nécessaire de mettre au point une nouvelle technique d'identification, telle que la PCR inverse, par exemple, permettant peut-être l'obtention de résultats plus fiables que la PCR semi-aléatoire.

Nos travaux ont permis de montrer que l'infection par des phages Pf4 superinfectifs active AlgU et SigX, les deux facteurs σ ECF majeurs de réponse au stress d'enveloppe chez *P. aeruginosa* (Figure 46). Nombre de phénotypes observés dans ces conditions sont également observés chez un mutant $\Delta oprF$ (Figure 46). De fait, il semblerait, au vu de l'ensemble des résultats décrits, que l'activation d'AlgU et SigX amène à un ensemble de régulations qui provoquerait la

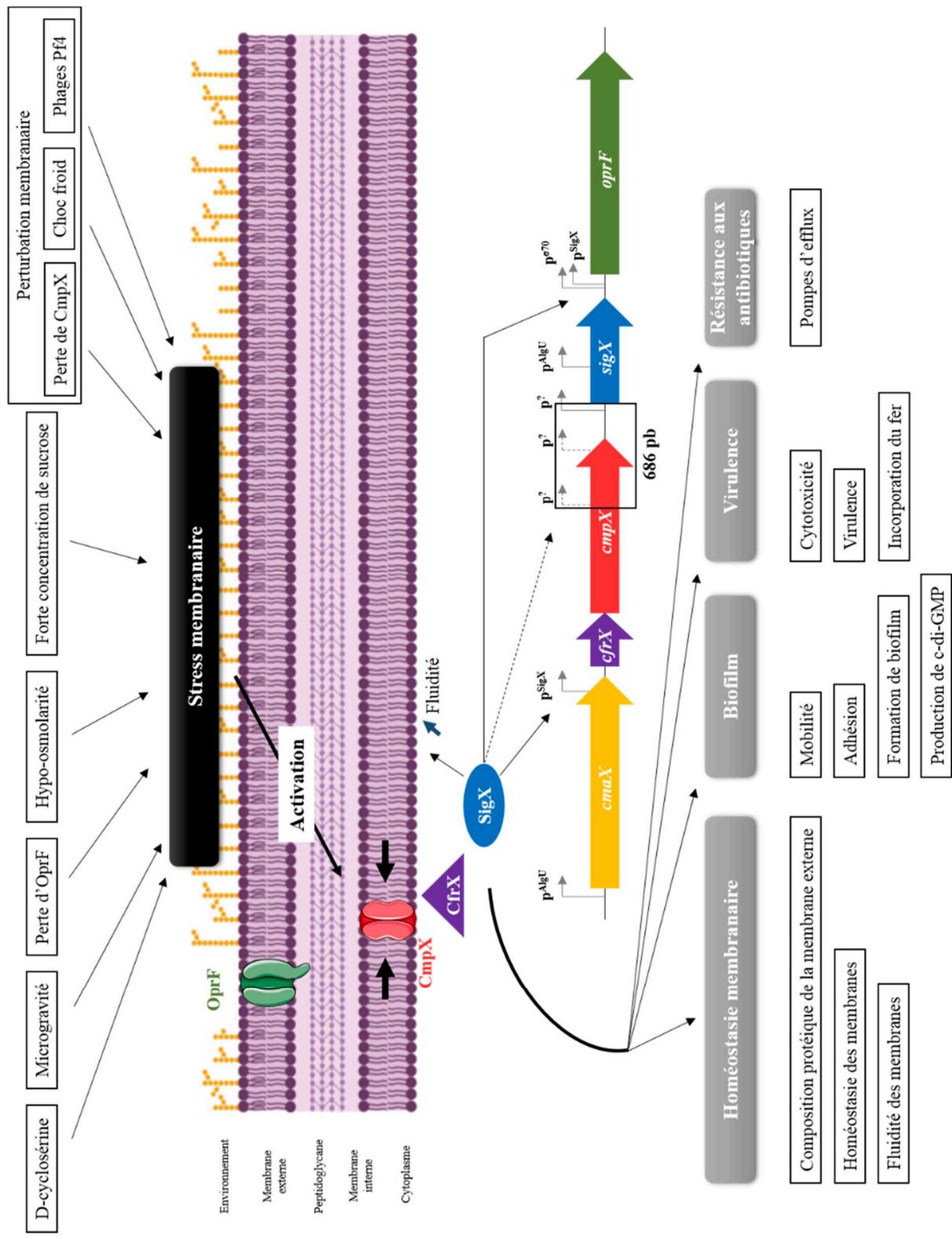


Figure 47. Schéma récapitulatif des conditions d'activations de SigX, les grandes fonctions régulées par ce dernier, et la régulation de son environnement génomique mis à jour.

En haut du schéma, les conditions conduisant à un stress membranaire et qui vont activer SigX. En bas du schéma, les grandes fonctions régulées par SigX. L'environnement génomique de *sigX* est représenté au milieu du schéma. Les régulations directes (flèches pleines noires) et indirectes (flèches noires en pointillés) de SigX sur la fluidité membranaire et sur les gènes de son environnement génomique sont également représentés. Les promoteurs identifiés sont représentés par les flèches grises pleines, et les putatifs par les flèches grises en pointillés. Les flèches noires de part et d'autres de CmpX représentent des tensions membranaires, exercés par les conditions représentées en haut du schéma.

transition entre un mode de vie planctonique et un mode de vie sessile. Celle-ci serait médiée, notamment via AmrZ, par l'activation de gènes codants les exopolysaccharides constituant la matrice du biofilm d'une part, et par l'augmentation du taux de c-di-GMP d'autre part. Ainsi, la virulence aiguë est diminuée dans ces conditions, de par la dérégulation du QS, de la cytotoxicité, et la diminution de la production de facteurs de virulence (**Figure 46**). Nos travaux suggèrent également que la lyse partielle observée lors des conditions de superinfection observée précédemment serait le fait de l'activation de la voie SOS due à la présence d'un taux anormalement élevé d'ADN simple brin lié à l'infection par les phages Pf4, qui active la synthèse des pyocines et mène à la lyse. Au vu des changements profonds observés dans ces conditions, il serait intéressant de poursuivre l'étude par des approches globales, par l'étude du transcriptome et du protéome dans ces conditions. Notamment, préciser la cause de la lyse partielle : existe-t-il des mécanismes de défense empêchant cette lyse qui se met en place chez certaines sous-populations de *P. aeruginosa* ? Les pili de type IV sont-ils liés à ce phénomène ? Il semble nécessaire de confirmer ou d'infirmer l'activité du SST3, au vu des régulations parfois contradictoires observées dans nos conditions. Enfin, une étude transcriptomique et protéomique globale pourrait être envisagée, au vu des nombreuses dérégulations déjà mises en évidence au cours de ce travail.

Nos travaux ont, de plus, permis de préciser les relations en termes de régulations entre les gènes situés en amont de *sigX*, *cmaX-cfrX-cmpX*, et les facteurs σ ECF de réponse au stress d'enveloppe, SigX et AlgU. Notamment, nous avons démontré que l'opéron de trois gènes prédit, n'en est pas un, mais est constitué de deux unités transcriptionnelles. La première est constituée de *cmaX* et la deuxième regroupe les gènes *cfrX-cmpX* qui sont, eux, co-transcrits et

forment un opéron (**Figure 47**). Nous avons montré que *cmaX* est régulé par AlgU, alors que l'opéron *cfrX-cmpX* est régulé, au moins en partie, par SigX (**Figure 47**). Ces résultats ont pu être décrits grâce à la découverte d'une nouvelle condition d'activation de SigX, le choc froid. Nous avons montré qu'un choc chaud provoque l'activation d'AlgU et de RpoH, permettant la régulation de *cmaX*, alors qu'un choc froid active SigX, permettant la régulation de *cfrX-cmpX*. Plus exactement, il semble que ce soit la rigidité membranaire provoquée par le choc froid, ou par un traitement à la valinomycine, qui semble être la condition d'activation de SigX.

En lien avec cette précédente découverte, nous avons montré qu'un mutant $\Delta cmpX$ provoque de profonds changements membranaires et morphologiques, avec notamment une désorganisation des membranes et une augmentation de la rigidité membranaire en profondeur du cœur hydrophobe. Dans ces conditions, nous avons constaté une augmentation de l'expression de *sigX*, ainsi que de certaines de ses cibles, indiquant une activation de ce facteur σ ECF. Il semble donc que SigX soit activé en réponse à des perturbations membranaires, et plus particulièrement, lors de la rigidification des membranes, à l'origine de tensions membranaires. Son activation permettrait ainsi d'augmenter la fluidité membranaire, ce qui pourrait se traduire par une certaine relaxation de ces tensions. De plus, la perte du canal mécanosensible CmpX, dont nous avons confirmé le rôle, entraîne une diminution de la production de C₄-HSL ainsi que de rhamnolipides. Pour la première fois, nous avons montré l'impact profond que peut avoir un canal mécanosensible sur la physiologie bactérienne, autre que la protection face à des conditions d'hypo-osmolarité. Ces découvertes ouvrent la porte à de futures études. Par exemple, il semble nécessaire d'étudier ce mutant $\Delta cmpX$ par des approches globales. L'activation de SigX entraînant la bactérie vers un mode de vie sessile, il semblerait intéressant d'étudier la formation de biofilm chez cette souche. L'étude d'une souche surexprimant ce canal mécanosensible permettrait également de préciser son impact sur la physiologie et la pathogénie bactérienne.

De plus, au vu de sa co-transcription avec *cfrX*, il semble nécessaire de préciser les fonctions de ce dernier, notamment déterminer s'il est bel et bien le facteur anti-sigma de SigX, et de préciser les interactions physiques entre les membres de ce supposé système fonctionnel constitué de SigX, CfrX et CmpX.

En résumé, nos travaux ont permis de découvrir trois nouvelles conditions d'activation de SigX : un traitement par des phages Pf4 superinfectifs, le choc froid, et la perte du canal mécanosensible CmpX (**Figure 47**). Ces conditions impactent la rigidité membranaire, ce qui augmenterait les tensions intra-membranaires. CmpX pourrait ressentir ces tensions, et activer

SigX en réponse, peut-être via CfrX (**Figure 47**). Nous avons également précisé la régulation des gènes *cmaX-cfrX-cmpX*, et découvert que *cfrX-cmpX* est régulé par SigX, tandis que *cmaX* est régulé par AlgU (**Figure 47**). De plus, grâce à certains travaux réalisés en amont de cette thèse, la région régulatrice de *sigX* a été caractérisée, et est composée d'au moins trois promoteurs (**Figure 47**). Une fusion transcriptionnelle entre cette région promotrice et une cassette rapporteur a été réalisée, et une banque de mutants par transposition a été constituée afin de permettre la caractérisation de nouveaux régulateurs transcriptionnels de *sigX*. Enfin, l'ensemble de ces résultats a permis de découvrir de nouveaux indices quant aux liens unissant les protéines CmpX, CfrX et SigX.

Ce nouveau système putatif de transduction de signaux, inédit, permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour combattre ce pathogène opportuniste, toujours responsable, faute de thérapie efficace, de l'aggravation des symptômes de la mucoviscidose lors de son installation au sein des poumons des patients atteints par cette maladie génétique.

Tableau 6. Tableau des souches utilisées dans cette étude.

Espèce bactérienne	Souche	Caractéristiques	Référence
<i>Escherichia coli</i>	OP50	Nourriture pour <i>Caenorhabditis elegans</i>	Stiernagle, 2006
	JM109	Hôte de clonage	Promega (Madison, Wisconsin, Etats-Unis)
	S17.1	λ pir (reconnaît l'origine de répllication <i>oriR6Kγ</i>), <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu Km	Simon et al., 1983
	S17.1 Mini-CTX-Lux	<i>E. coli</i> S17.1 + vecteur Mini-CTX-Lux	Ce travail
	S17.1 Mini-CTX-psigX::lux	<i>E. coli</i> S17.1 + vecteur Mini-CTX-psigX::lux	Ce travail
	S17.1 pBT20	S17.1 + vecteur pBT20	Ce travail
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H103	Souche prototrophe dérivée de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Bob Hancock's Lab, Vancouver, Canada)	Hancock et Carey, 1979
	H103 Mini-CTX-Lux	H103 + Mini-CTX-Lux intégré dans son génome	Ce travail
	dH103	H103 + Mini-CTX-psigX::lux intégré dans son génome	Ce travail
	dH103Pf4 ⁺	Mutant par transposition de la souche <i>P. aeruginosa</i> dH103	Ce travail
	Δ algU	H103 Δ algU	Ce travail
	H636 (Δ oprF)	H103 Δ oprF	Woodruff et Hancock, 1989
	PAOSX (Δ sigX)	H103 Δ sigX	Bouffartigues et al., 2012
	PAOPX (Δ cmpX)	H103 Δ cmpX	Ce travail
	MPAO1 Δ rpoH	Mutant par transposition <i>rpoH</i> ::IS; <i>phoA</i> /hah-Tcr	Jacobs et al., 2003

Matériel et Méthodes

I. Matériels

1. Souches, milieux et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude, ainsi que leurs principales caractéristiques, ont été listées en **tableau 6**. Différents milieux de cultures ont également été utilisés, listés en **tableau 7**. De manière générale, *P. aeruginosa* a été cultivée en milieu riche LB contenant 10 g.L⁻¹ de NaCl (noté LB10), ou en LB contenant 50mM de NaCl (LB50mM) et *E. coli* en LB5, contenant 5 g.L⁻¹ de NaCl. Certaines expériences ont nécessité des concentrations différentes en NaCl, et seront précisées ultérieurement. Certains milieux ont été solidifiés en ajoutant 15 g.L⁻¹ d'agar (milieux notés G). Les milieux ayant servi à tester les mobilités de *P. aeruginosa* ont été réalisés avec de l'agar noble, comme le milieu servant à dénombrer les plages de lyse. Le milieu minimum M63 a été utilisé dans le cadre de la constitution de la banque de mutants par transposition. La sélection de *P. aeruginosa* à l'issue de la conjugaison avec *E. coli* a été réalisée sur milieu gélosé (Pseudomonas Isolation Agar, ou PIA). Les milieux M9, CELKA et NGM ont été utilisés dans le cadre du test de survie de *C. elegans*. Ces milieux ont été stérilisés par autoclavage à 121°C, à une pression de 1 Bar pendant 20 min. Le milieu DMEM a quant à lui été utilisé dans le cadre de la culture de la lignée cellulaire immortalisée A549.

Les précultures et cultures d'*E. coli* et *P. aeruginosa* ont été réalisées en aérobiose à 37°C sous agitation orbitale (180 rpm) dans un volume de milieu correspondant au 1/10^{ème} de volume du contenant. Les cultures ont été inoculées à une absorbance à 580 nm (A_{580}) de 0,08. Dans le cadre des expériences réalisées pour les articles avec le phage Pf4 ou le mutant dH103Pf4⁺, le milieu utilisé pour les cultures est le milieu LB50mM, correspondant à un milieu hypo-osmotique stimulant l'activité de SigX. Lors des manipulations réalisées en présence de Pf4, les cultures sontensemencées avec environ 1,5.10⁹ Pf4.mL⁻¹ (concentration finale). Lors des chocs de température, les cultures en milieu de phase exponentielle de croissance ($A_{580} \approx 0,5$) sont incubées soit à 4°C pendant 30mn, soit à 60°C pendant 15 mn. Lors des chocs osmotiques, les cultures en phase stationnaire avancée de croissance (24h) ayant crû en LB10 ou en LB1000 sont transférées en LB0.

Concernant l'évaluation de l'activité du promoteur de *sigX* par bioluminescence dans les mutants par transposition, ces derniers, ainsi que les souches de *P. aeruginosa* H103 Mini-

Tableau 7. Composition des milieux utilisés dans cette étude.

Milieu	Composants	Concentration	Source des composants
Luria-Bertani (LB)	Bactotryptone	10 g.L ⁻¹	AES laboratoire, Bruz, France
	Extraits de levure	5 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	NaCl	0 mM (LB0)	VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis
		50 mM (LB50)	
		5 g.L ⁻¹ (LB5)	
10 g.L ⁻¹ (LB10)			
1 M (LB1000)			
LB gélosé (LBG)	Agar	15 g.L ⁻¹	Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
LBG Swarm	Agar noble	7 g.L ⁻¹ (Swarm)	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
LBG Twitch		10 g.L ⁻¹ (Twitch)	
Gélose molle	Agar noble	7 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
<i>Pseudomonas</i> Isolation Agar (PIA)	Peptone	20 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	MgCl ₂	1,4 g.L ⁻¹	
	K ₂ SO ₄	10 g.L ⁻¹	
	Irgasan [®] (Triclosan)	0,025 g.L ⁻¹	
	Agar	13,6 g.L ⁻¹	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis
Glycérol	20 mL.L ⁻¹		
M63	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹	Thermo Fisher Scientific (Acros Organics), Waltham, Massachusetts, Etats-Unis
	KH ₂ PO ₄	13,6 g.L ⁻¹	Alpha Aesar Haverhill, Massachusetts, Etats-Unis
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 mg.L ⁻¹	VWR (Prolabo), Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM (base) + 4,5 g.L ⁻¹ de glucose		
	Glutamine	290 mg.L ⁻¹	
DMEM complet	Sérum de veau foetal (SVF)	10%	Lonza, Bâle, Suisse
	Pénicilline - Streptomycine	1%	

CTX-Lux et *P. aeruginosa* dH103 ont été ensemencées à une A_{580} de 0,08 dans des microplaques OptiPlates blanches avec couvercle et fond transparent de 96 puits (BD Falcon, San Jose, Californie, Etats-Unis). La bioluminescence et l'absorbance ont été mesurées simultanément toutes les 30 mn pendant 24h à 37°C sous agitation orbitale de 360 rpm dans un lecteur de plaque multimodal Spark (Tecan, Männedorf, Suisse). Les valeurs de bioluminescence (en Unités Relatives de Luminescence (URL)/0,5 seconde) ont été divisées par les valeurs d'absorbance à 580 nm, générant des valeurs de bioluminescence relative (en URL/0,5 seconde/ A_{580}). Les valeurs de bioluminescence relative du témoin négatif (*P. aeruginosa* H103 Mini-CTX-Lux) ont été soustraites de celles obtenues avec la souche *P. aeruginosa* dH103 et les mutants par transposition. Les mutants affichant une courbe de bioluminescence très différente de celle de *P. aeruginosa* dH103 ont été sélectionnés, et la localisation de leurs transposons a été recherchée.

Si nécessaire, pour les souches de *P. aeruginosa*, de la tétracycline (Tet), à une concentration de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de la gentamicine (Gm) à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou à 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (uniquement dans la sélection des *P. aeruginosa* sur PIA lors de la constitution de la banque de mutants par transposition), ou de la carbénicilline (Cb) à 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été utilisés. Si nécessaire, pour les souches d'*E. coli*, de la tétracycline à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de l'ampicilline (Amp) à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou de la Gm à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été utilisées.

Les souches de *P. aeruginosa* et *E. coli* sont conservées dans des cryotubes Microbank® (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada), constitués d'un mélange à 35% de sucrose et 7,5 % de glycérol, ou directement en glycérol à une concentration finale de 15%, pour la conservation des clones de la banque de mutants par transposition.

2. Plasmides et amorces

Les plasmides utilisés dans cette étude sont listés en **tableau 8**. Le Mini-CTX-Lux a été fourni par le Dr M. Cabeen (Harvard University, Boston, Etats-Unis). C'est un vecteur suicide chez *P. aeruginosa*, qui peut s'intégrer spécifiquement dans son génome par recombinaison sur le site *attB*. Il a été utilisé pour construire la souche rapportant l'activité promotrice de *sigX*, dans le cadre de la banque de mutants par transposition. Le vecteur pBT20 est un vecteur suicide chez *P. aeruginosa* portant le transposon Mini-Himar1, a été utilisé pour la mutagénèse aléatoire dans la souche rapporteur. Il a été fourni par le Pr. Alain Filloux (Imperial College, Londres, Grande-Bretagne). Le vecteur pAB133 est un vecteur utilisé pour l'étude des fusions transcriptionnelles avec la cassette *luxCDABE*, utilisé dans le cadre de l'étude de l'effet de la

Tableau 7 (suite). Composition des milieux utilisés dans cette étude.

Milieu	Composants	Concentration	Source des composants
M9	Na ₂ HPO ₄	6 g.L ⁻¹	Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis
	KH ₂ PO ₄	3 g.L ⁻¹	Alpha Aesar Haverhill, Massachusetts, Etats-Unis
	NaCl	5 g.L ⁻¹	VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis
	MgSO ₄	120 mg.L ⁻¹	Fisher Chemicals, Hampton, New Hampshire, Etats-Unis
<i>Caenorhabditis elegans</i> Liquid Killing Assay (CELKA)	NaCl	4 g.L ⁻¹	VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis
	Peptone	2,5 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	Bactotryptone	5 g.L ⁻¹	AES laboratoire, Bruz, France
	Extraits de levure	2,5 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
Nematode Growth Medium (NGM)	NaCl	3 g.L ⁻¹	VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis
	Protease peptone n°3	2,5 g.L ⁻¹	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	Agar	17 g.L ⁻¹	Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
	KH ₂ PO ₄	3,4 g.L ⁻¹	Alpha Aesar Haverhill, Massachusetts, Etats-Unis
	MgSO ₄	120 mg.L ⁻¹	Fisher Chemicals, Hampton, New Hampshire, Etats-Unis
	CaCl ₂	111 mg.L ⁻¹	Acros Organics, Hampton, New Hampshire, Etats-Unis
	Cholestérol	5 mg.L ⁻¹	Acros Organics, Hampton, New Hampshire, Etats-Unis

température sur l'expression de *cmaX-cfrX-cmpX*. Le pEXUGL et le pcM157 sont deux vecteurs utilisés dans le cadre de la construction du mutant $\Delta algU$, par la méthode *cre-lox*. Ces trois derniers ont été fournis par le Dr A. Bazire (LBCM, Lorient, France).

Le **tableau 9** contient les amorces utilisées dans le cadre de l'étude de l'effet de la température sur la régulation de *cmaX-cfrX-cmpX* (RACE-PCR, fusions transcriptionnelles). Les amorces listées en **tableau 10** ont été utilisées dans le cadre de la construction de la souche rapportant l'activité promotrice de *sigX*, ainsi que les amorces utilisées pour la localisation du transposon sur le génome des mutants. Les amorces listées en **tableau 11** sont celles utilisées lors des PCR quantitatives en temps réel (RT-qPCR), toutes études confondues. Le **tableau 12** contient les amorces utilisées dans le cadre de la mutagenèse de CmpX.

Les amorces ayant servi pour les PCR et les RT-qPCR ont généralement été dessinées à l'aide de Primer3, et Primer3Plus, respectivement. Certaines amorces de RT-qPCR ont également pu être dessinées à l'aide de PrimerExpress.

II. Méthodes

1. Techniques microbiologiques

a. Mobilité bactérienne

i. Swarming

A partir d'une préculture, les bactéries ont été diluées à une $A_{580} = 0,1$ et ont été ensemencées à la surface de la gélose à l'aide d'un cure-dent. Les boîtes ont été incubées 36h à 37°C, puis les diamètres de swarming ont été mesurés.

ii. Twitching

A partir d'une préculture, les bactéries ont été diluées à une $A_{580} = 0,1$. A partir de cette solution, 5 μ L ont été prélevés puis déposés à travers la gélose. En effet, le twitching est une mobilité visible à l'interface gélose / boîte de Petri. Après 48h d'incubation à 37°C, la gélose est jetée, et le twitching est coloré avec du cristal violet (Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) dilué à 0,4% par inondation de la boîte de Petri pendant 15 mn, puis rincé à l'eau distillée. Le diamètre du twitching est ensuite mesuré.

Tableau 8. Plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmides	Caractéristiques	Référence
Mini-CTX-Lux	<i>oriR6Kγ</i> , <i>oriT</i> , Tet ^R ; Mini-CTX 1 avec la cassette <i>luxCDABE</i>	Hoang et al., 2000
Mini-CTX- psigX:: <i>lux</i>	Mini-CTX-Lux + région promotrice de <i>sigX</i> clonée en amont de la cassette <i>lux</i>	Ce travail
pBT20	<i>oriR6Kγ</i> , <i>oriT</i> , <i>bla</i> , Gm ^R porté par le transposon Mini- <i>Himar1</i> , Transposase <i>Himar1</i> Mariner C9	Kulasekara et al., 2005
pAB133	Gm ^R , utilisé pour les fusions transcriptionnelles avec <i>luxCDABE</i>	Bazire et al., 2005
pABcmaXL	Gm ^R , pAB- <i>PcmaX-luxCDABE</i>	Ce travail
pABcfrXL	Gm ^R , pAB- <i>PcfrX-luxCDABE</i>	Ce travail
pABcmpXL	Gm ^R , pAB- <i>PcmpX-luxCDABE</i>	Ce travail
pEXUGL	Gm ^R , pEXalgU avec la cassette <i>lox-aacC1-lox</i>	Bazire et al., 2010
pcM157	Tc ^R , vecteur d'expression de <i>cre</i>	Quénée et al., 2005
pGEMT-easy	Ap ^R , <i>lacZ</i>	Promega
pEX100Tlink	Ap ^R	Quénée et al., 2005

Tableau 9. Amorces utilisées dans le cadre de l'effet de la température sur *cmaX-cfrX-cmpX*. Les nucléotides indiqués en minuscules ne sont pas présents sur le chromosome.

Nombre PA	Nom du gène	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
RACE-PCR			
PA1773	<i>cmaX</i>	ASP1cmaX ASP2cmaX	CAGGTAGTGC GCGAGGTTAGT CGGATTCAGGTTCACTCCAC
PA1774	<i>cfrX</i>	ASP1cfrX ASP2cfrX	GCAGAAGATGCGTTTTTCG GCGGAAATACGGGAAACC
PA1775	<i>cmpX</i>	ASP1cmpX ASP2cmpX	CAGGTAGTGC GCGAGGTTAGT CGGATTCAGGTTCACTCCAC
Fusions transcriptionnelles			
Amont PA1773	Amont <i>cmaX</i>	FCmaX RCmaX	taataagagctcGTTTCGTGTATGCCGACAACA taataactagttGCGCTTCCCTTGGTAAAAC
Amont PA1774	Amont <i>cfrX</i>	FCfrX RCfrX	taataagagctcGAGTTGATACGGGAGCGCAT taataactagttCATGTCTGTACGAGGGAGTG
Amont PA1775	Amont <i>cmpX</i>	FCmpX RCmpX	taataagagctcCTGCGGGACCTGCTCAAG taataactagttCACTCAGCCTTGTCAGC

b. Formation de biofilm

i. Biofilm statique

A partir d'une préculture, une centrifugation à 7500g, pendant 5 minutes à température ambiante, est réalisée. Après avoir jeté le surnageant, le culot est lavé par de l'eau physiologique stérile, puis l' A_{580} est ajustée à 0,1 en eau physiologique. Un mL de suspension bactérienne est déposé dans chaque puits d'une plaque 24 puits à fond en verre plat transparent (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) et incubé à 37°C, pendant deux heures, pour permettre l'adhésion des bactéries. L'eau physiologique est ensuite remplacée par 1 mL de milieu LB et la plaque est incubée pendant 22h à 37°C.

Après ces 22h d'incubation, les puits de la plaque sont vidés et les biofilms sont délicatement rincés deux fois avec de l'eau physiologique stérile, puis sont colorés avec une solution de marqueur fluorescent de SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) à 5 μ M finale pendant 15 minutes. Les biofilms sont rincés une fois à l'eau physiologique et observés au microscope confocal à balayage laser.

ii. Biofilm dynamique

L'étude de la formation de biofilm en conditions dynamiques a été réalisée selon le protocole développé depuis 2009 par l'équipe de Tolker-Nielsen (**Pamp et al., 2009; Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011**).

Les biofilms sont formés dans des chambres de flux appelées flow-cell (Biocentrum, DTU, Danemark). Une flow-cell est formée de 3 canaux de 1 x 40 x 4 mm et est fermée par le dessous par une lamelle de verre de 24 x 50 mm (Deckgläser Thickness No. 1, Knittel Glass, Allemagne) scellée par une fine couche de silicone transparent (Clear Super Silicone Sealant, 3M, St-Paul, MN, Etats-Unis). Cette lamelle de verre sert de support pour l'adhésion des bactéries et la formation du biofilm.

La flow-cell est continuellement alimentée en milieu grâce à une pompe péristaltique et des tuyaux en silicone de 1 x 3 mm (Saint Gobain Performance Plastic). Des pièges à bulles sont situés entre la pompe et les flow-cell, afin de prévenir le passage de bulles d'air pouvant endommager le biofilm. Après assemblage, le système complet est nettoyé au TFD9 (Franklab, Montigny-Le-Bretonneux, France), rincé à l'eau distillée, puis stérilisé à l'eau de Javel 0,5% pendant 2h. Le système est ensuite rincé avec de l'eau physiologique stérile sur la nuit.

Tableau 10. Amorces utilisées dans le cadre de la construction et l'exploitation de la banque de mutants par transposition. N indique la présence d'un des quatre nucléotides, et S indique la présence d'un nucléotide C ou G.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
SpsigXHindIII	TAATAAAAGCTTGAGTCGCTCGGCCTGCA
ASpsigXBamHI	TAATAAGGATCCGTGGAACAGCTCCGAGTGCG
SluxCminiCTXlux	TGCGGACGTCAAATCAACAG
ASupstreamMCS-miniCTXlux	GAACTTCAGAGCGCTTTTGAA
SluxEcont	TCGTCACTACTGTCAGGCAC
ASchromPA2604	AGGCCGAGGTACATGTTGAG
Rnd1-ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGAG
Rnd1-ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC
Rnd1-ARB3	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT
Rnd1-ARB4	GGCCACGCGTCGACTAGTACSNNNNNNNSNSSSGCG
Rnd1-TnM20	TATAATGTGTGGAATTGTGAGCGG
Rnd2-ARB	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Rnd2-TnM20	ACAGGAAACAGGACTCTAGAGG
BT20TnMSeq	CACCCAGCTTTCTTGTACAC

Le système est ensuite clampé de part et d'autre des flow-cell et les erlenmeyers contenant le milieu de culture sont reliés au système en conditions stériles. À partir d'une préculture, une centrifugation à 7500g, pendant 5 minutes à température ambiante, est réalisée. Après avoir jeté le surnageant, le culot est lavé par de l'eau physiologique stérile, puis l' A_{580} est ajustée à 0,1 en eau physiologique. L'inoculation se fait par injection de 300 μL de suspension bactérienne par canal de flow-cell. Après une étape d'adhésion de 2h à 37°C, le système est déclampé et un flux de milieu d'un débit de 2,5 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ est appliqué pendant 22h. Une fois le biofilm formé, la pompe est stoppée et le système est clampé. 300 μL d'une solution de marqueur fluorescent SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) à 5 μM sont ajoutés dans chaque canal, pendant 15 mn. L'excédent est rincé par un flux de milieu pendant 5 minutes. Les biofilms marqués sont ensuite observés au microscope confocal à balayage laser.

iii. Adhésion

L'adhésion est réalisée en flow-cell, selon le même protocole que présenté précédemment. Après les 2h d'adhésion en eau physiologique, 300 μL d'une solution de marqueur fluorescent de SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) à 5 μM sont ajoutés dans chaque canal, pendant 15 mn. L'excédent est rincé par un flux d'eau physiologique stérile pendant 5 mn. Les bactéries adhérentes sont ensuite observées au microscope confocal à balayage laser.

c. Test de sensibilité aux phages

Les phages Pf4 sont récupérés du mutant par transposition dH103Pf4⁺, qui les produit constitutivement. Après 24h de culture, 1 mL est prélevé et centrifugé à 8000g pendant 5 mn, et le surnageant est filtré sur filtre 0,22 μm et stocké à 4°C. La titration a été effectuée par la méthode des plages de lyse en double couche, comme décrit précédemment (**Kropinski et al., 2009**), avec quelques modifications. La couche du dessous est du LBG, et celle du dessus de l'agar noble (gélose molle dans le tableau des milieux). Des dilutions des surnageants filtrés au 1/10^e ont été effectuées en LB, puis 10 μL de ces dilutions ont été ajoutés à la souche cible (*P. aeruginosa* H103) ajustée à $A_{580}=0,1$ et à 5 mL de gélose molle en surfusion maintenue à 60°C. Ce mélange a été étalé sur une boîte de LBG, et incubé 24h à 37°C avant comptage des plages de lyse formées et évaluation du titre.

d. Dosage des HSL

À partir d'une culture bactérienne, 5 mL sont centrifugés à 7500g pendant 10 mn. Après récupération du surnageant, les HSL sont extraites deux fois par de l'acétate d'éthyle (vol/vol)

Tableau 11. Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.

Nombre PA	Nom du gène	Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')
PA0668.1	16SrRNA	qPCR-16S-F	AACCTGGGAACTGCATCCAA
		qPCR-16S-R	CTTCGCCACTGGTGTTCCTT
PA0044	<i>exoT</i>	qPCR- <i>exoT</i> -F	TCGAGGCTTCCCGTACCCA
		qPCR- <i>exoT</i> -R	CAGGGCGACCTTGTCCATT
PA0161	PA0161	qPCR-PA0161-F	TAAAGCCCGATGAGTCGAAG
		qPCR-PA0161-R	ATTTCCGGACACTGGAAACC
PA0376	<i>rpoH</i>	qPCR- <i>rpoH</i> -F	CGCAAACCTGGAAGCCTA
		qPCR- <i>rpoH</i> -R	GAACAACGAAGCGCAGGT
PA0409	<i>pilH</i>	qPCR- <i>pilH</i> -F	GTGATCATCGTCACCACCAA
		qPCR- <i>pilH</i> -R	TTTCAGCAGGGTCTCTTCGT
PA0527.1	<i>rsmY</i>	qPCR- <i>rsmY</i> -F	CGCCAAAGACAATACGGAAAC
		qPCR- <i>rsmY</i> -R	TTTTGCAGACCTCTATCCTGACATC
PA0610	<i>prtN</i>	qPCR- <i>prtN</i> -F	ATTGGTCTACCGCATCTTCG
		qPCR- <i>prtN</i> -R	GGCCTTGCTGAAGTTTTCTT
PA0612	<i>ptrB</i>	qPCR- <i>ptrB</i> -F	GCCAACGAACTGGTCCTG
		qPCR- <i>ptrB</i> -R	GCAGTCCTCGCAGTCTTCC
PA0613	PA0613	qPCR-PA0613-F	ACGTGGTGGTGGAGCACTAT
		qPCR-PA0613-R	CAGGCGCAGATAAAAGGTGT
PA0652	<i>vfr</i>	qPCR- <i>vfr</i> -F	CGAAACGCTGTTCTTCATCA
		qPCR- <i>vfr</i> -R	GAAATCACCGCTGTTGAGGT
PA0717	PA0717	qPCR-PA0717-F	CGTAGAGATTTGCACCTTCCA
		qPCR-PA0717-R	ACAGCCACCAACTCTTCGAC
PA0762	<i>algU</i>	qPCR- <i>algU</i> -F	CACGCCCTGAAGGACATC
		qPCR- <i>algU</i> -R	CAAATCCTCGGGCAACTG
PA0762	<i>algU</i>	qPCR- <i>algU</i> -Fbis	TACCTGGCTGTATCGGATCG
		qPCR- <i>algU</i> -Rbis	GAAGAACTCCGCATCCTCTG
PA0934	<i>relA</i>	qPCR- <i>relA</i> -F	AGGCCAGCTCCAACCATTAC
		qPCR- <i>relA</i> -R	TCGATATCGACCCGCAGTTG
PA0996	<i>pqsA</i>	qPCR- <i>pqsA</i> -F	CGGAGTTGCTGGCATTGC
		qPCR- <i>pqsA</i> -R	CTGTTGCCCATGCCATAGC
PA1000	<i>pqsE</i>	qPCR- <i>pqsE</i> -F	GGCTGGGACTTGGCGTAG
		qPCR- <i>pqsE</i> -R	GGCTGGGACTTGGCGTAG
PA1003	<i>pqsR</i>	qPCR- <i>pqsR</i> -F	AACCTGGAAATCGACCTGTG
		qPCR- <i>pqsR</i> -R	TGAAATCGTCGAGCAGTACG
PA1097	<i>fleQ</i>	qPCR- <i>fleQ</i> -F	CGCGAAGACCTCTACTACCG
		qPCR- <i>fleQ</i> -R	CGAGATCAGTTCGTTGAGCA
PA1148	<i>toxA</i>	qPCR- <i>toxA</i> -F	ACGAGAAGCCTTCGAACATC
		qPCR- <i>toxA</i> -R	TGACGAAGAAGGTGGCATC

(Merck, Darmstadt, Allemagne). La phase organique (supérieure) est récupérée à chaque extraction, après centrifugation (4500g, 5 mn) et ajoutée dans un tube. Une pointe de Na₂SO₄ (Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis), est ajoutée dans ce tube, pour enlever les traces d'eau éventuelles, puis après une dernière centrifugation (4000g, 1 mn), l'extrait est transféré dans un nouveau tube et évaporé. Les extraits secs sont dissous dans 500 µL d'acétonitrile, et analysés par chromatographie liquide à détection UV couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC-UV-HRMS) micrOTOF-Q II (Bruker, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis). Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec le Pr. Alain Dufour et Laure Taupin, du Laboratoire de Biologie et Chimie Marine (LBCM, EA3884, Université de Bretagne Sud, Lorient). Les dosages ainsi effectués sont ensuite normalisés par l'absorbance de la culture bactérienne mesurée lors du prélèvement.

e. Dosages des facteurs de virulence

i. Elastase

A partir d'une culture, les bactéries sont centrifugées (2500g, 10 mn), et le surnageant est filtré sur filtre de porosité 0,22 µm. Ensuite, 50 µL d'échantillon sont déposés dans un microtube contenant 20 mg (+/- 0,2 mg) d'Elastine Congo Red (Σ-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) et 1 mL d'un tampon Tris (Thermo Fisher Scientific (Acros Organics), Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) 0,1 M pH 7,2 + CaCl₂ 1 mM (Thermo Fisher Scientific (Acros Organics), Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), puis sont incubées 18h à 37°C sous agitation. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 100 µL d'EDTA (Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) à 0,12 M froid, puis les tubes sont centrifugés 1 mn à 5000g. Les surnageants sont alors dosés à 490 nm, et ces dosages sont normalisés sur l'absorbance de la culture bactérienne mesurée lors du prélèvement.

ii. Rhamnolipides

L'extraction des rhamnolipides a été réalisée à partir de 20 mL d'une culture bactérienne. Après centrifugation à 3200g pendant 5 mn, le surnageant est récupéré et ajusté à pH 2,3 (+/- 0,2) par de l'HCl 1 N. Trois extractions par de l'acétate d'éthyle (vol/vol) ont ensuite été réalisées, puis les extraits ont été évaporés (même procédure que pour l'extraction des HSL).

La quantification des rhamnolipides a été réalisée par la technique au bleu de méthylène (**Rasamiravaka et al., 2016**). Brièvement, les extraits secs sont repris dans du chloroforme et mélangés à une solution de bleu de méthylène par vortex pendant 5 mn, puis sont incubés 15 mn. Ils sont ensuite mélangés à de l'HCl 0,2 N et incubés 10 mn. L'absorbance de la phase

Tableau 11 (suite). Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.

Nombre PA	Nom du gène	Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')
PA1181	PA1181	qPCR-PA1181-F	CCAGATGGAGAAGCGCTACCT
		qPCR-PA1181-R	CGCTTGCGACTGTCGATATC
PA1430	<i>lasR</i>	qPCR-lasR-F	CGGTTTTCTTGAGCTGGAAC
		qPCR-lasR-R	GCCGAACAGGATCTTCGAG
PA1432	<i>lasI</i>	qPCR-lasI-F	TGGCCCCTACATGCTGAAG
		qPCR-lasI-R	AGATGTGCGGCGAGCAA
PA1494	<i>muiA</i>	qPCR-muiA-F	AAAGCTTCGAACTGGCACTG
		qPCR-muiA-R	GATGCGGAATTCGTAGTTGAC
PA1713	<i>exsA</i>	qPCR-exsA-F	ATCGAGGAGTTGCTGATGCT
		qPCR-exsA-R	TCCATGAATAGCTGCAGACG
PA1727	<i>mucR</i>	qPCR-mucR-F	CCACGAGCTGATGATCAATG
		qPCR-mucR-R	TCGAACTCTCGAAGAAGCAG
PA1773	<i>cmaX</i>	qPCR-cmaX-F	AAAGGGCCGAAGACAGCAT
		qPCR-cmaX-R	CGCGATCGGTCAGGTAGTG
PA1774	<i>cfrX</i>	qPCR-cfrX-F	CTGCGGGACCTGCTCAAG
		qPCR-cfrX-R	GCCGACCTGGCGATTG
PA1775	<i>cmpX</i>	qPCR-cmpX-F	TATCTGGACCCAGAGCTTGC
		qPCR-cmpX-R	GAAGCCGAGCAGAACGAC
PA1776	<i>sigX</i>	qPCR-sigX-F	AATTGATGCGGCGTTACCA
		qPCR-sigX-R	CCAGGTAGCGGGCACAGA
PA1776	<i>sigX</i>	qPCR-mut-sigX-F	TTGGCTCGTCCATGTCAATC
		qPCR-mut-sigX-R	CATGATATCCGCTATCTCCTGAAA
PA1777	<i>oprF</i>	qPCR-oprF-F	GCGTACAGCTGGACATGAAG
		qPCR-oprF-R	TTCATGAAGTCAGCCAGGTTCTT
PA1803	<i>lon</i>	qPCR-lon-F	CAGTTGGGCAAGAAAGTCC
		qPCR-lon-R	TGCTTCTGCTCGATCTTCAG
PA1897	PA1897	qPCR-PA1897-F	TTCGTCAACACCTTCGTCAC
		qPCR-PA1897-R	GTGAATACCTCGATGCGTTG
PA1898	<i>qscR</i>	qPCR-qscR-F	AGGGGAATGGAAAAGCAGAT
		qPCR-qscR-R	GGGTGTATTCCAGGAGACCA
PA1899	<i>phzA2</i>	qPCR-phzA2-F	GGTTTACCGACAACCTGGAATTGC
		qPCR-phzA2-R	AACAGGCTGTGCCGCTGTAACC
PA2072	PA2072	qPCR-PA2072-F	CCAGGCATCAGGACGACAT
		qPCR-PA2072-R	CGATTCTGCAGCGCCTTT
PA2232	<i>pslB</i>	qPCR-pslB-F	ACACCAACGAATCCACCTTCA
		qPCR-pslB-R	CGCTCTGTACCTCGATCATCAC
PA2523	<i>czcR</i>	qPCR-czcR-F	ACTTCATGGTCAAGCCGTTT
		qPCR-czcR-R	ACTCCTTGGTGTCAGGTTG

aqueuse acide est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 638 nm, et le dosage est effectué grâce à une courbe d'étalonnage de rhamnolipides purs. Ces dosages sont ensuite normalisés sur l'absorbance de la culture bactérienne mesurée lors du prélèvement.

iii. Pyocyanine

L'extraction de la pyocyanine a été réalisée à partir d'une culture bactérienne. Après centrifugation à 8000g pendant 10 mn, 2 mL de surnageant sont mélangés à 2 mL de chloroforme (Thermo Fisher Scientific (Acros Organics), Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). La phase aqueuse jaune est jetée, et 1 mL d'HCl (Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) 0,5 N est ajouté à la phase organique. La phase aqueuse rose est ensuite dosée par spectrophotométrie à 520 nm, et le dosage est normalisé par l'absorbance de la culture bactérienne mesurée lors du prélèvement.

iv. Pyoverdine

Le dosage de la pyoverdine a été réalisée à partir d'une culture bactérienne. Après une centrifugation à 8000g pendant 10 mn, le surnageant est prélevé et la pyoverdine directement dosée par spectrophotométrie à 520 nm. Le dosage est normalisé par l'absorbance de la culture bactérienne mesurée lors du prélèvement.

f. *Cytométrie en flux*

i. Viabilité cellulaire

A partir d'une culture bactérienne, 1 mL est prélevé. Après centrifugation (8000g, 5mn), le culot est lavé deux fois par du PBS (Lonza, Bâle, Suisse), puis dilué jusqu'à environ 10^5 cellules.

Dans le cadre de l'étude de dH103 et de dH103Pf4⁺, les cellules sont marquées par du SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) pendant 15 mn, puis la fluorescence a été détectée à une longueur d'onde de 525 nm (filtre de bande passante de 40 nm) via l'excitation par un laser bleu 22 mW à une longueur d'onde de 488 nm.

Dans le cadre de l'étude de l'effet des chocs osmotiques et de température sur le mutant $\Delta cmpX$, un témoin avec 100% de mortalité cellulaire par ajout d'éthanol est réalisé. Les cellules sont marquées par le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis), et analysées par le cytomètre de flux CytoFlex S (Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, Indiana, Etats-Unis). La fluorescence verte (SYTO9) et la fluorescence rouge (Iodure de Propidium) ont été détectées à une longueur d'onde de 525 nm

Tableau 11 (suite). Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.

Nombre PA	Nom du gène	Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')
PA2570	<i>lecA</i>	qPCR- <i>lecA</i> -F	ATCCGGGGCGATGTCATTACC
		qPCR- <i>lecA</i> -R	CAAAACGCATCGTGGCAGAT
PA2585	<i>uvrC</i>	qPCR- <i>uvrC</i> -F	AGGACAGCTATTTCCGCAAC
		qPCR- <i>uvrC</i> -R	TTCCTTCGAGGAACATCACC
PA2896	<i>sbrI</i>	qPCR- <i>sbrI</i> -F	GGCAAGGTCTCTACCGTTTTTC
		qPCR- <i>sbrI</i> -R	AGGTTTCCTGGTAGATCTCGTC
PA3006	<i>psrA</i>	qPCR- <i>psrA</i> -F	CGATTTTCGGCGTGAACACTT
		qPCR- <i>psrA</i> -R	CGAAGAACGGCACCATCAG
PA3007	<i>lexA</i>	qPCR- <i>lexA</i> -F	AAGCCGAGATCCTCTCCTTC
		qPCR- <i>lexA</i> -R	GACTTGAAGCCGAGTTCCTG
PA3008	<i>sulA</i>	qPCR- <i>sulA</i> -F	GTGGTCAGTTGGCTGGAAC
		qPCR- <i>sulA</i> -R	TATTCAGGCTCTGTGCTTGG
PA3063	<i>pelB</i>	qPCR- <i>pelB</i> -F	CGGCTACGTGCAGCGTTAT
		qPCR- <i>pelB</i> -R	CACTGCATGCGTTCCTTGAC
PA3217	<i>cyaB</i>	qPCR- <i>cyaB</i> -F	ACCGTGTTCTTCTCCGACAT
		qPCR- <i>cyaB</i> -R	CGTTGAGGTAGTTGTTGAGCA
PA3305.1	<i>phrS</i>	qPCR- <i>phrS</i> -F	CAACTGGAGGCCATCAACAT
		qPCR- <i>phrS</i> -R	CCTTGCGTGCTCTGTGTATC
PA3385	<i>amrZ</i>	qPCR- <i>amrZ</i> -F	CGTGAGCAGATCGCAGAA
		qPCR- <i>amrZ</i> -R	GCTCGTGCAGGCTGAGTT
PA3476	<i>rhlI</i>	qPCR- <i>rhlI</i> -F	GGCTGGGACTTGGCGTAG
		qPCR- <i>rhlI</i> -R	GGCTGGGACTTGGCGTAG
PA3477	<i>rhlR</i>	qPCR- <i>rhlR</i> -F	CTGGGCTTCGATTACTACGC
		qPCR- <i>rhlR</i> -R	CCCGTAGTTCTGCATCTGGT
PA3479	<i>rhlA</i>	qPCR- <i>rhlA</i> -F	AACATTTCAACGTGGTGCTG
		qPCR- <i>rhlA</i> -R	ATTTCCACCTCGTCGTCCTT
PA3540	<i>algD</i>	qPCR- <i>algD</i> -F	GATGCTCGGTTGTTGATG
		qPCR- <i>algD</i> -R	TCGTGGCTGGTGATGAGAT
PA3540	<i>algD</i>	qPCR- <i>algD</i> -Fbis	GGGCTATGTCGGTGCAGTATG
		qPCR- <i>algD</i> -Rbis	GCGACTTGCCCTGGTTGAT
PA3617	<i>recA</i>	qPCR- <i>recA</i> -F	GTAACGCACTGAAGTTCTACGC
		qPCR- <i>recA</i> -R	TGTTCTTCACCACCTTGACG
PA3621.1	<i>rsmZ</i>	qPCR- <i>rsmZ</i> -F	CGTACAGGGAAACACGCAAC
		qPCR- <i>rsmZ</i> -R	TTCAGTCCCTCGTCATCATC
PA3622	<i>rpoS</i>	qPCR- <i>rpoS</i> -F	CACTTCCTTCTCTTCCAAACAACAC
		qPCR- <i>rpoS</i> -R	AGCTGCGTTGCGTCCAA
PA3639	<i>accA</i>	qPCR- <i>accA</i> -F	TCTTCGGCAATCTGTCCAGTT
		qPCR- <i>accA</i> -R	GTAGCCGATGTAGTCGAGGGTA

(filtre de bande passante de 40 nm) et 690 nm (filtre de bande passante de 50 nm), respectivement, via l'excitation par un laser bleu 22 mW à une longueur d'onde de 488 nm.

ii. Vésicules

A partir d'une culture, les bactéries ont été centrifugées. Le surnageant a ensuite été soumis à deux centrifugations successives (Beckman coulter Life science, Indianapolis, Indiana, États-Unis) : 16000g pendant 20 mn puis une ultra-centrifugation à 120000g pendant 2h à 8°C. Le culot est alors repris dans 8 mL de tampon Mu (NaCl 200 mM ; Tris/HCl 20 mM pH 7,5 ; CaCl₂ 1 mM ; MgSO₄ 20 mM) et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est finalement repris dans 500 µL de tampon Mu pendant une nuit à 4°C pour réhydratation. Les vésicules extraites ont été marquées au niveau membranaire avec 0,05 µg.mL⁻¹ de fluorochrome FM4-64 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et incubées 10 mn à l'obscurité. La mesure de la fluorescence émise a été effectuée à 690 nm grâce à un laser bleu à 488 nm (22 mW). La mesure de la taille a été réalisée par cytométrie en flux en utilisant le paramètre SSC (Side Scatter, diffusion latérale de la lumière émise) grâce au laser violet 405 nm. Afin d'estimer la taille des vésicules, des billes de 100 nm (T1115P001, Interchim, Montluçon, France) et de 400 nm (T1115P002, Interchim, Montluçon, France) ont été soumises aux mêmes mesures.

2. Tests de virulence

a. Cytotoxicité sur lignée cellulaire A549

i. Culture cellulaire

Les cellules A549 (Σ-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) sont des cellules épithéliales alvéolaires de carcinome pulmonaire humain. Elles sont incubées à 37°C, en atmosphère humide et enrichie à 5 % de CO₂. Lorsque les cellules deviennent confluentes (monocouche occupant plus de 90 % de la surface du flask), un passage est réalisé. Le tapis cellulaire est rincé délicatement avec du PBS, puis les cellules sont décollées de façon enzymatique avec 2 mL de trypsine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) pendant 10 à 15 minutes à 37°C avec 5 % de CO₂. Un volume identique de milieu contenant du sérum de veau fœtal (SVF) est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine. L'ensemble est centrifugé 2 minutes à 1900 rpm, puis le culot est resuspendu dans du DMEM complet à 10 % de SVF. Un flask ou une plaque de 24 puits sontensemencés avec cette suspension cellulaire, selon la manipulation (passage simple de cellule dans le flask, ou test de cytotoxicité dans la plaque de 24 puits).

Tableau 11 (suite). Amorces de RT-qPCR utilisées dans cette étude.

Nombre PA	Nom du gène	Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')
PA3724	<i>lasB</i>	qPCR- <i>lasB</i> -F	AACCGTGCGTTCTACCTGTT
		qPCR- <i>lasB</i> -R	TGGTGGCGGTCCAGTAGTA
PA3841	<i>exoS</i>	qPCR- <i>exoS</i> -F	TCTCTACACCGGCATTCACTAC
		qPCR- <i>exoS</i> -R	CCTTGGTCGATCAGCTTTTG
PA4210	<i>phzA1</i>	qPCR- <i>phzA1</i> -F	AACCACTACATCCATTTCCTTCG
		qPCR- <i>phzA1</i> -R	CGGCTATTCCCAATGCAC
PA4234	<i>uvrA</i>	qPCR- <i>uvrA</i> -F	ATCGTGATCACCGGTCTTTC
		qPCR- <i>uvrA</i> -R	TCCATCATCGACAGGAACTG
PA4407	<i>ftsZ</i>	qPCR- <i>ftsZ</i> -F	CATGAGCGAAATGGGCATGG
		qPCR- <i>ftsZ</i> -R	AGGTTGACGTCTTCCAGCAG
PA4481	<i>mreB</i>	qPCR- <i>mreB</i> -F	CAAGGTCCACGAGAACAGCT
		qPCR- <i>mreB</i> -R	TTCGATCAGGAACACCTCGC
PA4495	PA4495	qPCR-PA4495-F	CCCTCTACAGCGAAAACCAG
		qPCR-PA4495-R	TCGTAGACCGGATAGCTGTTG
PA4525	<i>pilA</i>	qPCR- <i>pilA</i> -F	ACCCGCTGAAGACCACTGTT
		qPCR- <i>pilA</i> -R	CGGTGCGAGTAGAAGCAGTAGTAC
PA4554	<i>pilY1</i>	qPCR- <i>pilY1</i> -F	GGCTGGGACTTGGCGTAG
		qPCR- <i>pilY1</i> -R	GGCTGGGACTTGGCGTAG
PA4625	<i>cdrA</i>	qPCR- <i>cdrA</i> -F	GACGCCTACGTCAACAGTCA
		qPCR- <i>cdrA</i> -R	GTTACCGGTGATCGCGTACT
PA4843	<i>gcbA</i>	qPCR- <i>gcbA</i> -F	CCTGGGCACCGAATTGG
		qPCR- <i>gcbA</i> -R	CGGCGGACAGGTAGATGATC
PA4847	<i>accB</i>	qPCR- <i>accB</i> -F	AAGCCATGAAGATGATGAACC
		qPCR- <i>accB</i> -R	CGTTCTCCACCAGGATCGA
PA4853	<i>fis</i>	qPCR- <i>fis</i> -F	ACAACGCCAACCTGAAACAG
		qPCR- <i>fis</i> -R	AGTTGTGCAATGCCTTCTCC
PA5174	<i>fabY</i>	qPCR-PA5174-F	AGGGCGACCTGGAGATCAT
		qPCR-PA5174-R	GCGCGTCCTTCTTGTATACCA
PA5261	<i>algR</i>	qPCR- <i>algR</i> -F	TTGTCGATGACGAACCTCTG
		qPCR- <i>algR</i> -R	GTCCAGTTGCCCTACCAATC
PA5272	<i>cyaA</i>	qPCR- <i>cyaA</i> -F	CGCTTCAAGGAGCAGGTATT
		qPCR- <i>cyaA</i> -R	GAGATGGCGATAGACCAGGA
PA5338	<i>spoT</i>	qPCR- <i>spoT</i> -F	CTCCGAGTCGATCAACCTCG
		qPCR- <i>spoT</i> -R	TGCGTTCCTGGGGAATCTTC

ii. Tests de cytotoxicité par dosage de la lactate déshydrogénase

Lorsque les cellules forment une monocouche confluyente au fond des puits de la plaque, le milieu des puits de la plaque est remplacé par du DMEM (900 μL par puits). A partir d'une culture bactérienne, les cellules sont prélevées, centrifugées (10000g, 5 mn), et le culot est resuspendu dans du DMEM. Les bactéries sont diluées jusqu'à une $A_{580} = 0,8$, puis 100 μL de cette solution bactérienne est déposé dans chaque puits. Un témoin négatif (aucune mortalité cellulaire) est réalisé. Les plaques sont incubées 20h à $37^{\circ}\text{C} + 5\%$ de CO_2 . 100 μL de surnageant sont ensuite prélevés et la quantité de Lactate Déshydrogénase (LDH) est évaluée à l'aide du kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), de façon relative aux témoins négatif et positif de mortalité cellulaire (puits avec du DMEM sans bactéries, et puits avec une solution de lyse, respectivement).

b. Virulence sur modèle *C. elegans*

Les nématodes telluriques *C. elegans* de la souche ancestrale Bristol N2 ont été obtenus auprès du CGC (Caenorhabditis Genetic Center, Minneapolis, Minnesota, Etats-Unis). Ils croissent sur des géloses NGM à 22°C . Avant le dépôt des vers sur les géloses NGM, celles-ci sontensemencées avec *E. coli* OP50, qui leur sert de source de nourriture.

Une synchronisation de la population des vers est nécessaire pour travailler sur des individus au même stade de développement. Pour cela, les vers présents sur gélose NGM sont exposés à une solution d'hypochlorite de sodium et d'hydroxyde de sodium, jusqu'à ce qu'ils se dissolvent, libérant ainsi les œufs qu'ils contiennent. La réaction est ensuite stoppée par du milieu M9. Une centrifugation permet de récupérer les œufs afin de les déposer sur une nouvelle gélose contenant *E. coli* OP50. Les tests de virulence sont effectués lorsque les vers ont atteint un stade de développement L4, qui intervient 48h après la synchronisation de la population.

Le test réalisé avec ce modèle est le slow-killing. Il est réalisé sur plusieurs jours en milieu gélosé. Le nématode va se nourrir de bactéries présentes sur la gélose qui vont alors former un biofilm dans leur système digestif. La veille du test, à partir d'une préculture, 50 μL de suspension bactérienne ($A_{580} = 0,1$) en milieu CELKA (**Tableau 7**) sont étalés sur une gélose NGM (**Tableau 7**) complémentée avec 5 mg.mL^{-1} de FUDR (5-fluoro-2'-désoxyuridine, Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis). Ce composé permet d'empêcher le développement des œufs pondus par les vers, évitant donc l'apparition de nouveaux nématodes au cours de l'expérience. Les géloses sont incubées à 37°C sur la nuit et les vers contenus dans le milieu M9 sont déposées sur les géloses. Ces dernières sont incubées à 22°C et un dénombrement

visuel est réalisé tous les jours à l'aide d'un microscope optique (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

3. Techniques de microscopie

a. Microscopie confocale à balayage laser

Pour les études concernant le biofilm, le microscope confocal à balayage laser LSM710 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) piloté par le logiciel Zen2009 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) utilisant l'objectif à immersion à huile x63 a été utilisé. Le SYTO9 est excité à 485 nm et la fluorescence émise est mesurée entre 495 et 550 nm. Trois acquisitions d'images par canal sont réalisées puis analysées par le plugin COMSTAT 2 (Heydorn et al., 2000; Vorregaard, 2008) au sein du logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012) afin d'extraire les données de biovolume, d'épaisseur moyenne et d'épaisseur maximale du biofilm sur chaque acquisition.

b. Microscopie électronique

Ces manipulations ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Julien Verdon et Emile Béré, du laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions (EBI, UMR6267, Université de Poitiers).

i. A transmission (MET)

A partir d'une culture, les cellules ont été récupérées et diluées dans du tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 6,8), afin d'obtenir une concentration de $5 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹. Après fixation pendant 1h (glutaraldéhyde 2,5 % en tampon phosphate 1 M pH 7,1), les cellules ont été lavées en PBS puis post-fixées pendant 45 mn (tétraoxyde d'osmium 1 % en tampon phosphate 1 M pH 7,1). La déshydratation des cellules a été réalisée par incubation dans des bains successifs de concentration croissante en éthanol (de 70 % à 100 %). Les cellules, finalement reprises dans 100 % d'éthanol, ont été centrifugées à 10000g et le culot a été inclus dans une résine epon. Après 24h de polymérisation, des coupes de 70 nm ont été réalisées (Ultramicrotome UC6 Leica, Wetzlar, Allemagne) et contrastées par de l'acétate d'uranyle 2 % (en éthanol 70 %) et du citrate de plomb pour la visualisation sous microscopie électronique (JEOL (Rueil-Malmaison, France) 1010 à 80 KV). Les images ont été enregistrées avec l'appareil photo numérique Olympus Quemesa et le logiciel Item.

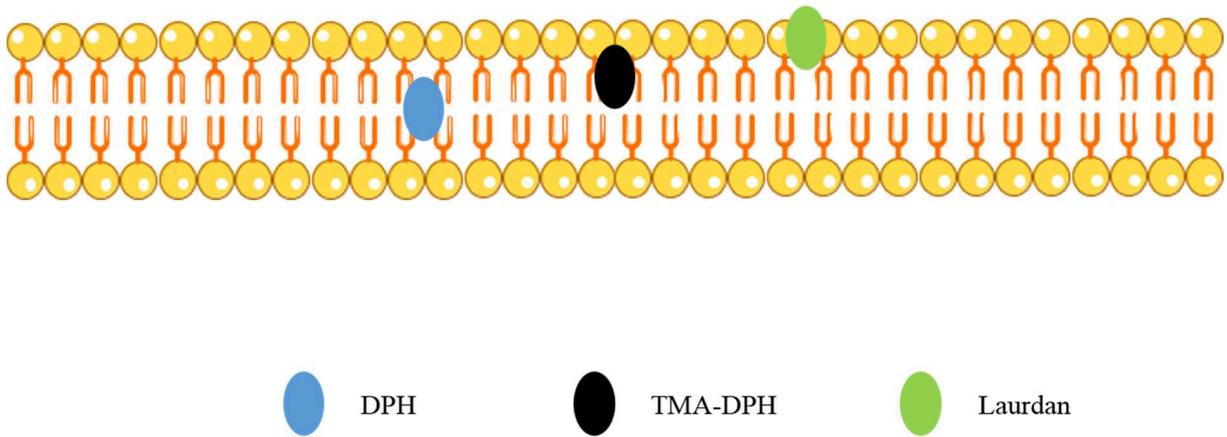


Figure 48. Localisation des sondes membranaires utilisées en anisotropie de fluorescence.

Localisation des sondes DPH (en bleu), TMA-DPH (en noir) et Laurdan (en vert) au sein de la membrane lors des mesures d'anisotropie de fluorescence ou de polarisation généralisée (Laurdan).

ii. A balayage (MEB)

A partir d'une culture, les cellules bactériennes ont été déposées sur une lame de verre de 12 mm et déshydratées par traitement avec du HMDS (Hexaméthylidisilazane). La surface de la lame a été recouverte par pulvérisation cathodique sous vide d'une couche en alliage or-palladium électriquement conductrice de 25 nm d'épaisseur (pulvérisation BALTEC Scd 005). Les images ont ensuite été enregistrées par le microscope électronique à balayage FEI VolumeScope (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) à 15 kV.

4. Techniques biochimiques

a. Anisotropie de fluorescence

A partir d'une culture, les bactéries sont récupérées et centrifugées (10000g, 5 mn). Le culot est lavé trois fois par un tampon Tris/HCl stérile (15 mM, pH 7) et resuspendu dans le même tampon. Les bactéries sont diluées à $A_{580} = 0,2$, puis marquées ou pas par la sonde fluorescente DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène, Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), son dérivé, la sonde TMA-DPH (1-(4-Triméthylammoniumphényl)-6-Phényl-1,3,5-Hexatriène p-Toluènesulfonate, Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), ou la sonde Laurdan (6-Dodécanoyl-2-Diméthylaminonaphthalène, Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à 4 μM final, à l'obscurité pendant 30 mn à 37°C. La première sonde s'insère en profondeur au niveau du core hydrophobe membranaire, la deuxième en surface du core hydrophobe, et la troisième au niveau du squelette glycérol des phospholipides (**Figure 48**). La lecture est effectuée dans des plaques 96 puits noires à fond noir et sans couvercle, grâce à un lecteur multimodal de microplaques Spark (Tecan, Männedorf, Suisse), dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 365 et 425 nm, respectivement pour les sondes DPH et TMA-DPH. Le facteur de corrélation G a été calculé comme le rapport de la lumière émise parallèlement et perpendiculairement, grâce à une excitation par une lumière émise horizontalement. L'anisotropie (r) a été calculée à partir des intensités de fluorescence d'émission mesurées parallèlement (I1) et perpendiculairement (I2) au plan de la lumière d'excitation selon l'équation suivante : $r = (I1 - I2) / (I1 + 2GI2)$. Pour la fluctuation de polarisation généralisée (GP) de la sonde Laurdan, l'intensité de fluorescence est mesurée à 430 et 495nm après une excitation à 340nm et calculée selon l'équation suivante : $GP = (I_{495} - I_{430}) / (I_{495} + I_{430})$.

b. Extraction des protéines de membrane externe

A partir d'une culture, 25 mL de bactéries ont été centrifugées à 8000g pendant 10 mn à 4°C, puis lavées avec 10 mL de PBS. Les cellules ont été reprises dans 4 mL d'une solution A (Tris/HCl 30 mM pH 8), avant d'être lysées par sonication (10 cycles de 1 mn) sur glace. Les cellules non lysées ont été éliminées par centrifugation à 8000g pendant 10 mn à 4°C, puis la fraction de protéines membranaires a été recueillie par ultracentrifugation à 120000g pendant 1h à 4°C du surnageant de la première centrifugation. Les protéines membranaires insolubles sont récupérées par une deuxième ultracentrifugation dans les mêmes conditions. Après un lavage avec 1 mL de solution A, le culot résultant a été repris dans 3 mL de solution B (Tris/HCl 30 mM pH 8 ; sarkosyl 2% ; Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) et resolubilisé à température ambiante pendant 1h. Les protéines de membrane externe insolubles dans le sarkosyl sont récupérées par ultracentrifugation à 120000g pendant 1h à 4°C. La fraction insoluble a été rincée avec 500 μ L de solution B et reprise dans 500 μ L d'eau ultrapure filtrée.

c. Electrophorèse bi-dimensionnelle

A partir de l'extraction précédente, un dosage colorimétrique de type Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis), dérivant de la méthode de Bradford, a été utilisé. La quantité de protéines dans l'échantillon a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA ; Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis).

La première dimension, l'isofocalisation électrique, a été réalisée à l'aide de bandelettes de 11 cm, pH 4-7, ReadyStrip IPG Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Elles ont été réhydratées pendant 16h à 20°C (Protean IEF Cell, Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) avec 250 μ L de solution de réhydratation (Urée 5 M ; Thio-urée 2 M ; CHAPS 2 % ; SB3-10 2 % ; ampholytes 1 % ; Tris 0,2 % ; Triton X 0,5 %) contenant 150 μ g de protéines selon les paramètres de migration suivants : 15 mn de 0 à 250V ; 2h de 250 à 4000V ; maintien à 4000V jusqu'à 30000 V.H⁻¹. Les bandelettes ont ensuite été équilibrées 5 mn dans le tampon d'équilibration I (Urée 6 M ; SDS 2 % ; Tris/HCl 0,375 M pH 8,8 ; Glycérol 20 % ; DTT 130 mM) puis 5 mn dans le tampon d'équilibration II (Urée 6 M ; SDS 2 % ; Tris/HCl 0,375 M pH 8,8 ; Glycérol 20 % ; Iodoacétamide 135 mM).

La seconde dimension a été réalisée sur gel de séparation SDS-PAGE en conditions dénaturantes à 12 % d'acrylamide, en utilisant le système protean II xi (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis), à 10 mA par gel pendant environ 5h à 10°C. Les gels ont ensuite été

colorés avec 0,2 % de bleu de Coomassie (Merck, Darmstadt, Allemagne) solubilisé dans un mélange acide acétique / méthanol / eau (10/40/50) puis décolorés par ce mélange, sans bleu de Coomassie.

d. Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF

Les spots protéiques colorés dans l'étape précédente ont ensuite été découpés et décolorés dans un mélange acétonitrile / bicarbonate d'ammonium 100 mM (vol/vol). Chaque échantillon a ensuite été digéré pendant une nuit à 37°C dans 20 µL d'une solution de trypsine à 13 ng.µL⁻¹ (Trypsin Gold, Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis). Les peptides ont ensuite été extraits dans 20 µL de tampon d'extraction composé d'acide formique et d'acétonitrile (1 vol / 2 vol) pendant 30 mn à 37°C puis une sonication de 5 mn a été effectuée. Les produits de digestion ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI / TOF-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Quadrupole/Time of flight - time of flight). Dans ces manipulations, 1 µL/0,5 µL d'échantillon/ de calibrant (peptide calibration standard II, Bruker, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis) a été déposé sur la plaque cible MALDI (Bruker, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis) mélangé avec 1 µL de matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et évaporé à l'air. La plaque a ensuite été placée dans un AutoFlex III (Bruker, Billerica, Massachusetts, Etats-Unis). Les échantillons ont été ionisés avec un faisceau laser à (λ) 337 nm. Chaque spectre MS a été établi sur 2000 impacts de laser. Pour les spectres MS / MS, les ions monochargés les plus représentatifs ont été soumis à la fragmentation avec une énergie de collision de près de 0,05 eV/ Da. Les spectres obtenus après fragmentation ont été analysés par le logiciel FlexAnalysis puis identifiés à l'aide du logiciel BioTools pour la recherche d'homologies dans les bases de données NCBI et Swissprot.

e. Extraction et analyse de la composition lipidique des membranes

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Pr. Hermann J. Heipeiper, du Department of Environmental Biotechnology, à l'UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research de Leipzig.

A partir d'une culture, les bactéries ont été récupérées par centrifugation, et le culot a été lavé trois fois dans du PBS stérile. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 13000g pendant 15 mn, à 4°C, puis le culot a été repris dans de l'eau ultra-pure, et lyophilisé (Heto PowerDry PL9000-50/HSC500 Freeze Dryer, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-

Unis). Les méthyls esters d'AG (FAME) ont été préparés par incubation des extraits dans un mélange à 14% de trifluorure de bore / méthanol à 95°C pendant 15 mn, suivi d'une extraction par de l'hexane (Morrison et Smith, 1964). Les FAME ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Agilent Technology, 6890 Network GC system, Santa Clara, Californie, Etats-Unis). Les échantillons ont été séparés par un capillaire CP-Sil 88 50 m de longueur x 250 µm de diamètre (Chrompack, Middleburg, Pays-Bas). Les FAME ont été identifiés par la co-inoculation de standards de référence (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, Etats-Unis), et ont été quantifiés sur la base de l'aire des pics de chromatographie. Le degré de saturation a été déterminé par le ratio entre AG saturés et AG insaturés.

5. Techniques de biologie moléculaire

a. Extraction des acides nucléiques

i. ADN génomique

A partir d'une préculture, les bactéries sont centrifugées à 12000g pendant 5 mn, puis l'ADN génomique est extrait à l'aide du kit GeneJET Genomic DNA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), selon les recommandations du fournisseur. L'intégrité de l'ADN génomique a été appréciée par électrophorèse sur gel d'agarose (Σ Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) à 0,8 % (en TAE 1x (4,84 g.L⁻¹ Tris ; 1,142 mL.L⁻¹ d'acide acétique 100% ; 2 mL.L⁻¹ d'EDTA 0,5 M pH 8)) et sa concentration a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Leur pureté a été appréciée en calculant les rapports A_{260}/A_{230} et A_{260}/A_{280} .

ii. ADN plasmidique

A partir d'une préculture, les bactéries sont centrifugées à 12000g pendant 5 mn, puis les plasmides sont extraits à partir des culots à l'aide du kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), selon les recommandations du fournisseur. La taille et l'intégrité des plasmides ont été appréciées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (en TAE 1x) et leur concentration a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Leur pureté a été appréciée en calculant les rapports Abs_{260}/Abs_{230} et Abs_{260}/Abs_{280} .

iii. ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode classique du phénol acide chaud. A partir d'une culture, environ 10^9 bactéries ($\sim A_{580} = 1$) ont été récupérées par centrifugation (12000g, 1 mn), puis fixées si besoin par un mélange éthanol 100 % / acétone (vol / vol) froid et conservées à -20°C . Les bactéries sont lysées dans 300 μL de tampon de lyse (acétate de sodium 20 mM ; SDS 0,5% ; EDTA 1 mM), puis les ARN totaux sont extraits deux fois dans 600 μL de phénol acide chaud, 60°C , pH 4,3 (Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) additionné de 100 μL d'eau traitée au pyrocarbonate d'éthyle (DEPC ; Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis). Après incubation pendant 3 mn à 60°C , la phase aqueuse contenant les ARN a été séparée de la phase organique contenant l'ADN génomique et les protéines par centrifugation à 18700g pendant 4 mn. Après cette double extraction, 500 μL d'un mélange chloroforme / alcool isoamylique (en proportions 24 / 1 ; Σ -Aldrich, Saint Louis, Missouri, Etats-Unis) ont été ajoutés à la phase aqueuse. Après centrifugation à 18700g pendant 4 mn, la phase aqueuse a été récupérée, puis les ARN totaux ont été précipités à l'éthanol froid 100 % en présence de 100 mM d'acétate de sodium pendant au moins 3h. Le précipité a été récupéré par centrifugation à 18700g pendant 30 mn à 4°C , puis rincé avec 1 mL d'éthanol 75 % froid, avant d'être repris dans 45 μL d'eau traitée DEPC (Σ -Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis). L'ADN génomique contaminant a été éliminé par ajout de 10 unités de DNase I (New England Biolabs (NEB), Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) dans un mélange réactionnel contenant 6,25 mM de MgCl_2 . Après incubation à 37°C pendant 1h, l'absence d'ADN génomique a été contrôlée par PCR avec le couple d'amorces qPCR-mut-sigX-F / qPCR-mut-sigX-R (**Tableau 11**). Si nécessaire, l'échantillon a été de nouveau traité à la DNase I pendant 1h, puis l'absence d'ADN génomique a été de nouveau contrôlée par PCR. La DNase I a ensuite été inactivée par ajout de 1 μL d'EDTA 0,5 M à 75°C pendant 10 mn. La qualité et l'intégrité des ARN totaux ont été appréciées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (en TAE 1x), et leur concentration a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm au NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Leur pureté a été appréciée en calculant les rapports A_{260}/A_{230} et A_{260}/A_{280} .

iv. c-di-GMP

Ces manipulations ont été réalisées comme décrit précédemment, mais avec quelques modifications (**Spangler et al., 2010**; **Strehmel et al., 2015**). A partir d'une culture, les bactéries ont été centrifugées (12000g, 5 mn). Le culot a été repris en eau physiologique, puis les cellules ont été centrifugées à 8000g, 4°C pendant 2 mn, en duplicat pour chaque condition. Les culots bactériens ont été repris dans 600 μL de tampon d'extraction glacial (acétonitrile /

méthanol / eau ultrapure (2 vol / 2 vol / 1 vol)). 5 μl de xanthosine-(3'-5')-cyclic monophosphate (CXMP, Biolog Life Science Institute, Bremen, Germany) à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été ajouté dans un des deux réplicats, servant de calibrant interne. Après 15 mn d'incubation sur glace, les cellules ont été lysées à 95°C pendant 10 mn puis centrifugées à $20000g$, 4°C , pendant 5 mn. Les surnageants de chaque échantillon ont été récupérés puis conservés sur glace. Les culots ont été resuspendus dans $400 \mu\text{L}$ de tampon d'extraction puis incubés sur glace pendant 15 mn, avant une centrifugation à $15000g$, 4°C pendant 5 mn. Après trois répétitions de l'extraction, les surnageants obtenus et combinés sont évaporés à 43°C . Les nucléotides obtenus sont ensuite récupérés dans $500 \mu\text{L}$ d'eau ultrapure afin d'être quantifiés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS/MS). La séparation chromatographique a été réalisée par un système 1100 Series HPLC (Agilent, Waldbronn, Allemagne) utilisant une colonne HPLC Multospher AQ RP 18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$; CS Chromatography Service GmbH, Langerwehe, Allemagne) dans un mode de gradient utilisant 10 mM d'acétate d'ammonium avec $0,1 \%$ d'acide acétique comme éluant A et du méthanol en éluant B. La spectrométrie de masse par ionisation par électronébuliseur a été réalisée par un spectromètre de masse API 4000 triple quadrupole (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-Unis).

Ces analyses ont été effectuées par le Dr. Gerald Brenner-Weiß au Karlsruhe Institute of Technology en Allemagne.

b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR ont été réalisées sur 500 ng d'ADN génomique ou plasmidique, ou sur une colonie bactérienne. Le mix réactionnel final dans $50 \mu\text{L}$ contient 250 nM de chaque amorce, 200 nM de dNTPs (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis), 5 unités de Taq DNA polymérase (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) dans son tampon (20 mM de Tris/HCl pH 8,8 ; 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 mM de KCl ; 2 mM de MgSO_4 ; $0,1 \%$ de triton X-100, NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis). La taille, la qualité et la quantité des produits PCR obtenus ont ensuite été appréciées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (en TAE 1x). Si besoin, une purification des amplicons PCR a été réalisée par le kit GeneJET PCR Purification (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

c. Rétro-transcription

Les ARN totaux, une fois extraits, ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit High Capacity cDNA RT (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-Unis), selon les recommandations du fournisseur. La synthèse d'ADNc a été réalisée dans un volume final de 50 μ L à partir de 2,5 μ g d'ARN pendant 2h à 37°C, suivie d'une inactivation de la rétro-transcriptase à 85°C pendant 5 mn. Des échantillons témoins sans rétro-transcriptase ont été réalisés dans les mêmes conditions. Leur qualité a ensuite été appréciée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (en TAE 1x).

d. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les couples d'amorces ont été testés et validés en vérifiant que l'efficacité de la PCR soit au-dessus de 0,9, et qu'un seul produit PCR à la température de fusion souhaitée soit obtenu.

L'amplification a été réalisée à l'aide de l'appareil 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-Unis). La réaction a été effectuée dans 13 μ L en présence de 6,5 μ L de Fast SYBR Green PCR Master Mix, 600 nM de chaque amorce (**Tableau 11**) et 6,5 ng d'ADNc. Le programme suivant a été utilisé pour l'amplification : une étape à 95°C pendant 20 s, puis 40 cycles à 95°C (3 s), 60°C (30s) et 72°C (30 s), et enfin un cycle pour déterminer la courbe de fusion. La sonde ROX interne au Fast SYBR Green PCR Master Mix a été utilisée comme référence pour normaliser les variations de fluorescence non spécifiques de la réaction PCR (étape entièrement automatisée par l'appareil et le logiciel). La quantification relative des ARNm a été calculée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en utilisant l'ARNr 16S comme contrôle endogène. L'analyse des résultats a été effectuée par le logiciel Data Assist puis par une feuille de calcul sur Microsoft Excel.

e. RACE-PCR

Cette technique a été utilisée dans le cadre de la confirmation des sites d'initiation de transcription prédits par utilisation du kit 3'/5' RACE 2nd Generation (Roche, Bâle, Suisse). Les ADNc ont été produits à partir de 1 μ g d'ARN totaux en utilisant l'amorce spécifique du gène AS1 (**Tableau 9**), puis ont été purifiés par utilisation du kit High Pure PCR product purification (Roche, Bâle, Suisse). Une PCR nichée a ensuite été réalisée en utilisant l'amorce AS2 (**Tableau 9**) spécifique du gène et une amorce oligo d(T). Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis), et séquencés

pour identifier la queue 5' de l'ARNm spécifique (Beckman Coulter Genomics, Brea, Californie, Etats-Unis).

f. Clonage

i. Digestion et ligature

Les digestions ont été réalisées sur des produits PCR ou des vecteurs. Elles ont été réalisées à 37°C, pendant 30 mn dans un volume réactionnel de 10 µL contenant environ 1 µg d'ADN, 20 unités d'enzymes de restriction et son tampon approprié (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis). L'inactivation des enzymes a été réalisée soit par la chaleur soit par utilisation du kit de purification PCR GeneJET PCR Purification (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). La taille des fragments résultant de la digestion a été appréciée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (en TAE 1x).

La ligature entre un fragment PCR et son vecteur a été réalisée dans un ratio 3 pour 1, respectivement, dans un volume final de 30 µL, contenant 200 ng de vecteur, 600 ng de fragment PCR, 400 unités de T4 DNA Ligase et son tampon (50 mM de Tris/HCl ; 10 mM de MgCl₂ ; 1 mM d'ATP; 10 mM de dithiothréitol ; pH 7,5 ; NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis). Le mélange réactionnel a été incubé sur la nuit à 4°C, et le résultat de la ligature a été apprécié par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, avant d'être utilisé pour la transformation bactérienne.

ii. Transformation bactérienne

Les cellules d'*E. coli* compétentes ont été transformées par choc thermique. Environ 100 ng d'ADN plasmidique ont été ajoutées à 50 µL de bactéries compétentes et incubés pendant 20 mn sur glace. Le choc thermique a été réalisé par transfert des cellules à 42°C pendant 45s, puis sur glace pendant 2 mn. Les cellules ont été reprises dans 500 µl de LB puis incubées à 37°C pendant 1h30. Les transformants ont été sélectionnés sur une gélose LB contenant l'antibiotique approprié.

Les cellules de *P. aeruginosa* ont été transformées par électroporation. Trois mL d'une culture en phase stationnaire avancée de croissance a été centrifugée à 16200g pendant 1 mn. Le culot bactérien a été rincé trois fois avec 1 mL d'une solution de sucrose à 300 nM avant d'être repris dans 200 µL de cette dernière. Environ 50 ng de d'ADN plasmidique ont été ajoutés à 100 µL de solution bactérienne dans une cuve d'électroporation. Les cellules ont été exposées à un choc électrique de 1800 V, avant d'être reprises dans 500 µL de LB et incubées à 37°C pendant 1h30. Les transformants ont été sélectionnés sur une gélose LB contenant l'antibiotique approprié.

Tableau 12. Amorces utilisées dans la construction du mutant de délétion $\Delta cmpX$.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
Cp1	CACCAGTTGCGTACCCTG
Cp2	TCAGCGGCTGAATTGCATGTTCACTCAGCC
Cp3	ATGCAATTCAGCCGCTGATCCGGGAGA
Cp4	AACAATCAGCCGCACA ACTT

g. Fusions transcriptionnelles

Les promoteurs d'intérêts (*cmaX*, *cfrX* et *cmpX*) ont été fusionnés à la cassette *luxCDABE* sans promoteur au sein du vecteur pAB133 (**Tableau 8**), par le biais des enzymes de restriction *SacI* et *SpeI*. Les insertions ont été vérifiées par séquençage, puis les plasmides ont été transformés par électroporation chez *P. aeruginosa* H103.

h. Mutation par délétion

Le mutant de délétion isogénique $\Delta algU$ a été construit par la méthode décrite par Bazire et collaborateurs (**Bazire et al., 2010**). Brièvement, le gène *algU* a été remplacé par une cassette de résistance à la gentamicine porté par le plasmide PEXUGL (dérivé du plasmide PEX100Tlink, **Tableau 8 ; Quénée et al., 2005**), après conjugaison avec *E. coli* S17.1 portant ce plasmide. Les souches résistantes à la gentamicine ont été sélectionnées, puis la cassette de résistance a été excisée et la construction génétique a été séquencée par les amorces AlgUI-AlgU4 (**Bazire et al., 2010**).

Le mutant de délétion isogénique $\Delta cmpX$, nommé PAOPX a été construit en suivant la procédure décrite par **Quénée et al., 2005**. Brièvement, les couples d'amorces Cp1-Cp2 et Cp3-Cp4 (**Tableau 12**) ont été utilisés pour l'amplification des régions flanquantes et la génération de la délétion par PCR chevauchante. Le fragment obtenu a été cloné dans le pGEMT-easy (**Tableau 8 ; Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis**) puis sous-cloné dans le pEX100Tlink (**Tableau 8 ; Quénée et al., 2005**) au site *EcoRI*. Le plasmide résultant a été séquencé avant d'être utilisé pour le transfert chez *P. aeruginosa*. Les doubles recombinants ont été sélectionnés pour leur résistance au sucrose 5% et leur caractère Carbénicilline sensible. Finalement, la souche PAOPX obtenue a été testée par PCR en utilisant les amorces Cp1 et Cp4.

i. Construction de la banque de mutants par transposition aléatoire

i. Construction de la souche rapportant l'activité promotrice de sigX

La région promotrice de *sigX* a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces SpsigXHindIII / ASpsigXBamHI (**Tableau 10**). Ce produit PCR et le Mini-CTX-Lux (**Tableau 8**) ont été digérés par *HindIII* et *BamHI* comme décrit précédemment, puis ligaturés, avant d'être introduit chez *E. coli* S17.1 par transformation. Ce clonage a été vérifié par séquençage, en utilisant les amorces SluxCminiCTXlux / ASupstreamMCS-miniCTXlux (**Tableau 10**).

Les vecteurs Mini-CTX-Lux et Mini-CTX-*psigX::lux* (**Tableau 8**) ont été insérés dans *P. aeruginosa* H103 par conjugaison pour générer les souches *P. aeruginosa* H103 Mini-CTX-Lux et *P. aeruginosa* dH103 (pour dérivée de H103), respectivement (**Tableau 6**), après intégration du vecteur dans le site *attB* du chromosome de la bactérie. Pour ce faire, les souches donneuses *E. coli* S17.1 Mini-CTX-Lux et *E. coli* S17.1 Mini-CTX-*psigX::lux*, et receveuse *P. aeruginosa* H103 ont été cultivées en milieu LB contenant ou non les antibiotiques appropriés jusqu'en phase exponentielle de croissance pour *E. coli* et en phase stationnaire pour *P. aeruginosa*. A partir de ces cultures, environ $1,5 \times 10^7$ cellules de *P. aeruginosa* H103 et environ $7,5 \times 10^6$ cellules d'*E. coli* S17.1 Mini-CTX-Lux ou *E. coli* S17.1 Mini-CTX-*psigX::lux* sont mélangées puis déposées sous la forme d'une goutte au centre d'une boîte contenant un milieu LBG sans pression de sélection. Après 24h de croissance à 37°C, la totalité des cellules est prélevée et resuspendue dans 1 mL de milieu LB sans antibiotique. Les cellules sont ensuite diluées en cascade et 100 µL de chaque dilution sont étalés sur des milieux gélosés PIA (**Tableau 7**) contenant $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tétracycline, permettant de sélectionner spécifiquement *P. aeruginosa* au détriment d'*E. coli* grâce au triclosan contenu dans le milieu PIA, et de *P. aeruginosa* H103 n'ayant pas reçu le Mini-CTX-Lux ou le Mini-CTX-*psigX::lux* grâce à la tétracycline. Les clones isolés sélectionnés ont été testés par PCR en utilisant les amorces SluxEcont / ASchromPA2604 (**Tableau 10**), et validés pour l'émission de luminescence liée à l'activité du promoteur de *sigX* en comparaison des clones témoins de *P. aeruginosa* H103 Mini-CTX-Lux ayant intégré le vecteur sans région promotrice.

ii. Constitution de la banque de mutants par transposition

La banque de mutants aléatoires a été construite par conjugaison entre la souche donneuse *E. coli* SM10 pBT20 et la souche receveuse *P. aeruginosa* dH103. Le vecteur pBT20, répliatif chez *E. coli* SM10 et suicide chez *P. aeruginosa*, est caractérisé par la présence du transposon Mini-*HimarI* et le gène codant la transposase « hyperactive » HimarI Mariner C9. Ce vecteur sera donc utilisé pour la transposition chez *P. aeruginosa*. Le protocole de conjugaison a été adapté de Kulasekara (**Kulasekara, 2014**). Les deux souches, *P. aeruginosa* dH103 et *E. coli* SM10 pBT20, ont été mises en culture pendant la nuit en LB, additionnées de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline pour *E. coli* et de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tétracycline pour *P. aeruginosa* pour le maintien des constructions. Pour chaque souche, 5 mL ont été prélevés et déposés par inondation sur des boîtes de Petri de 14 cm de diamètre contenant du LBG. Les géloses ont été mises à incuber pendant 24h à 37°C pour *E. coli* et à 42°C pour *P. aeruginosa*. La totalité de la biomasse de chaque gélose a été récupérée, resuspendue dans 2 mL de LB sans pression de sélection et l'A₅₈₀

a été mesurée. Les A_{580} ont ensuite été précisément ajustées à 40 pour la souche donneuse et à 20 pour la souche receveuse, puis 500 μL de chaque suspension ont été mélangés dans un microtube de 1,5 mL. L'ensemble du mélange a été déposé sur une boîte de Petri de 14 cm de diamètre contenant du LBG sous la forme de 20 spots de 50 μL , puis incubé à 37°C pendant 2h. A l'issue de cette croissance, l'ensemble des spots a été récupéré et repris dans 11 mL de milieu M63 (**Tableau 7**), puis 250 μL de cette suspension ont été étalés sur chacune des 20 boîtes de 14 cm contenant du milieu PIA gélosé additionné de gentamicine à 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour sélectionner spécifiquement les souches de *P. aeruginosa* ayant intégrées un transposon. Deux boîtes sélectives additionnelles ont été réalisées : une où la souche donneuse seule a étéensemencée, et l'autre où seule la souche receveuse a étéensemencée. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h. A l'issue de la conjugaison, les 9400 clones obtenus ont été inoculés dans des microplaques de 96 puits DeepWell (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) d'une contenance de 1,2 mL. Pour cela, 500 μL de LB ont été distribués dans chacun des puits. Puis chaque colonie a été prélevée et déposée dans un puits grâce à des cure-dents stériles. Sur chaque plaque, les deux premiers puits contiennent deux témoins (*P. aeruginosa* H103 Mini-CTX-Lux et *P. aeruginosa* dH103), qui seront utilisés ultérieurement lors de l'étape de sélection de régulateurs de l'expression de *sigX*. Les plaques ont été fermées par un couvercle empêchant les contaminations croisées entre les puits (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), puis mises en culture sous agitation orbitale à 37°C pendant 30h. Finalement, 500 μL de glycérol concentré à 30 % ont été déposés dans chaque puits. Après homogénéisation des suspensions, les plaques ont été conservées à -80°C.

j. Localisation du transposon dans les mutants

La localisation du transposon d'un mutant d'intérêt a été effectuée à l'aide de la technique de PCR semi-aléatoire, décrite initialement par Chun et collaborateurs (**Chun et al., 1997**), et adapté pour *P. aeruginosa* par Kulasekara (**Kulasekara, 2014**). Cette PCR repose sur le principe de la PCR nichée, en deux étapes, avec l'utilisation de plusieurs amorces listées dans le **Tableau 10**. La première étape consiste en une PCR contenant une amorce spécifique du transposon (Rnd1-TnM20) et de quatre amorces différentes (Rnd1-ARB1 à 4), précédemment utilisées dans le cadre de cette manipulation chez *P. aeruginosa* (**Chun et al., 1997**; **Jacobs et al., 2003**; **Kulasekara et al., 2005**; **O'Toole et Kolter, 1998**) et résumées par Kulasekara (**Kulasekara, 2014**). Ces dernières sont des amorces contenant une séquence définie, puis une séquence dégénérée, suivie par 4 ou 5 nucléotides définis. C'est donc 4 couples d'amorces qui

ont été testés par mutant. Après cette première amplification par PCR, une purification des amplicons est réalisée, comme décrit précédemment.

A partir de ces amplicons, une deuxième PCR est réalisée, avec une amorce spécifique située dans le transposon en amont de la première (Rnd2-TnM20), et une autre amorce, spécifique cette fois, de séquence identique à celle de la première PCR (Rnd2-ARB, voir **Tableau 10**). Généralement, au moins un produit PCR a été amplifié par l'un des couples d'amorces et séquencé (Beckman Coulter Genomics, Brea, Californie, Etats-Unis) afin d'identifier le gène muté par le transposon par BLAST.

k. Séquençage de génome entier

La qualité et la quantité de l'ADN génomique de dH103Pf4⁺ précédemment extrait ont été mesurées à l'aide d'un fluorimètre Qubit (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis). Les banques d'ADN ont été construites à l'aide du kit NexteraXT d'Illumina (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis), et le séquençage du génome a été réalisé à l'aide du kit Reagent v3 (2x250 pb, Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis), grâce à l'appareil Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis). Les données brutes en sortie du séquenceur ont été nettoyées avec Trimmomatic v.0.36 (**Bolger et al., 2014**) et la qualité des données a été vérifiée à l'aide de FastQC v.0.11.6.1. L'assemblage du génome de dH103Pf4⁺ a été effectué *de novo* à l'aide du logiciel Spades v.3.12.0 (**Bankevich et al., 2012**). Les assemblages obtenus ont été vérifiés pour leur cohérence, du point de vue du nombre de contigs, N50 (médiane de la longueur des contigs), pourcentage de GC, et taille de l'assemblage à l'aide de Quast v.5.0.0 (**Mikheenko et al., 2018**). La manipulation des séquences a été réalisée grâce au logiciel CLC Genomics Workbench 12 (Qiagen, Hilden, Allemagne).

6. Statistiques

Deux tests statistiques majoritaires ont été utilisés dans ce travail. Les deux sont des tests *t* bilatéraux, mais l'un est apparié, et l'autre est non-apparié. Le premier a été utilisé dans les travaux concernant les infections par le Pf4, étant donné que chaque culture (traitée et non traitée) provenait d'une seule et même préculture. Le deuxième a été utilisé pour le reste des travaux. En plus de ces tests majoritaires, un autre test statistique, le log-rank test, a été utilisé pour les tests de survie de *C. elegans*. Significativité : ^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Références bibliographiques

- A**dam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., Schumacher, U., 1997. “*Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose.” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 2102–2104.
- Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T., 2012a.** “The filamentous phage φ rSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato.” *Phytopathology* 102, 244–251.
- Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T., 2012b.** “Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by φ RSM filamentous phages.” *Phytopathology* 102, 469–477.
- Ainsaar, K., Mumm, K., Ilves, H., Hõrak, R., 2014.** “The ColRS signal transduction system responds to the excess of external zinc, iron, manganese, and cadmium.” *BMC Microbiol.* 14, 162.
- Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., Iglewski, B.H., 1997.** “Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 179, 3928–35.
- Alhede, M., Kragh, K.N., Qvortrup, K., Allesen-Holm, M., van Gennip, M., Christensen, L.D., Jensen, P.Ø., Nielsen, A.K., Parsek, M., Wozniak, D., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., Givskov, M., Bjarnsholt, T., 2011.** “Phenotypes of Non-Attached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates Resemble Surface Attached Biofilm.” *PLoS One* 6, e27943.
- Almblad, H., Harrison, J.J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., 2015.** “The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP.” *J. Bacteriol.* 197, 2190–2200.
- Amar, A., Pezzoni, M., Pizarro, R.A., Costa, C.S., 2018.** “New envelope stress factors involved in σ^E activation and conditional lethality of *rpoE* mutations in *Salmonella enterica*.” *Microbiology* 164, 1293–1307.
- Arnaud, I., Jarlier, V., 2017.** “Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France.” *InVS* 106.
- Ayers, M., Howell, P.L., Burrows, L.L., 2010.** “Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries.” *Future Microbiol.* 5, 1203–1218.
- B**ahia, F.M., de Almeida, G.C., de Andrade, L.P., Campos, C.G., Queiroz, L.R., da Silva, R.L.V., Abdelnur, P.V., Corrêa, J.R., Bettiga, M., Parachin, N.S., 2018. “Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*.” *Sci. Rep.* 8, 2905.
- Bainbridge, T., Fick, R.B., 1989.** “Functional importance of cystic fibrosis immunoglobulin G fragments generated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.” *J. Lab. Clin. Med.* 114, 728–33.
- Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J.M., Madoulet, C., Plotkowski, M.C., Chippaux, C., Puchelle, E., 1994.** “Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture.” *Infect. Immun.* 62, 4481–7.
- Balasubramanian, D., Kumari, H., Jaric, M., Fernandez, M., Turner, K.H., Dove, S.L., Narasimhan, G., Lory, S., Mathee, K., 2014.** “Deep sequencing analyses expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include small RNA-mediated regulation of iron acquisition, heat shock and oxidative stress response.” *Nucleic Acids Res.* 42, 979–98.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler,**

- G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012.** “SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.” *J. Comput. Biol.* 19, 455.
- Barbieri, J.T., Sun, J., 2004.** “*Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT,” in: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 79–92.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., Guery, B., 2018.** “How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections.” *Drugs Context* 7, 212527.
- Battesti, A., Bouveret, E., 2009.** “Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction.” *J. Bacteriol.* 191, 616–24.
- Battesti, A., Bouveret, E., 2006.** “Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism.” *Mol. Microbiol.* 62, 1048–1063.
- Bazire, A., Dheilly, A., Diab, F., Morin, D., Jebbar, M., Haras, D., Dufour, A., 2005.** “Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*.” *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 125–131.
- Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutéra, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L., Hémerly, G., Linossier, I., Chevalier, S., Wozniak, D.J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., 2010.** “The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 192, 3001–3010.
- Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., Mattick, J.S., 2002.** “Differential Regulation of Twitching Motility and Elastase Production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 184, 3605.
- Beaussart, A., Baker, A.E., Kuchma, S.L., El-Kirat-Chatel, S., O’Toole, G.A., Dufrière, Y.F., 2014.** “Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili.” *ACS Nano* 8, 10723–33.
- Bedi, B., Maurice, N., Sadikot, R., 2018.** “Microarchitecture of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A biological perspective.” *Biomed. Biotechnol. Res. J.* 2, 227.
- Bernard, C.S., Bordi, C., Termine, E., Filloux, A., de Bentzmann, S., 2009.** “Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* tad Locus, involved in Flp pilus biology.” *J. Bacteriol.* 191, 1961–73.
- Bertani, I., Ševo, M., Kojic, M., Venturi, V., 2003.** “Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS/RpoS* in *Pseudomonas*.” *Arch. Microbiol.* 180, 264–271.
- Bertrand, J.J., West, J.T., Engel, J.N., 2010.** “Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 192, 994–1010.
- Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., Li, Z., 1997.** “Interactions between biofilms and the environment.” *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 291–303.
- Bhagirath, A.Y., Pydi, S.P., Li, Y., Lin, C., Kong, W., Chelikani, P., Duan, K., 2017.** “Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*.” *ACS Infect. Dis.* 3, 162–175.
- Bhagirath, A.Y., Somayajula, D., Li, Y., Duan, K., 2018.** “CmpX Affects Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* Through the Gac/Rsm Signaling Pathway and by Modulating c-di-GMP Levels.” *J. Membr. Biol.* 251, 35–49.
- Bielecki, P., Puchałka, J., Wos-Oxley, M.L., Loessner, H., Glik, J., Kawecki, M., Nowak, M., Tümmler, B., Weiss, S., dos Santos, V.A.P.M., 2011.** “In-Vivo Expression Profiling of *Pseudomonas aeruginosa* Infections Reveals Niche-Specific and Strain-Independent Transcriptional Programs.” *PLoS One* 6, e24235.
- Blanka, A., Düvel, J., Dötsch, A., Klinkert, B., Abraham, W.R., Kaever, V., Ritter, C., Narberhaus,**

- F., Häußler, S., 2015.** “Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition.” *Sci. Signal.* 8.
- Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., Casilag, F., Duvel, J., Abraham, W.-R., Kaever, V., Haussler, S., 2014.** “Identification of the Alternative Sigma Factor SigX Regulon and Its Implications for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity.” *J. Bacteriol.* 196, 345–356.
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L., 1983.** “Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.” *Rev. Infect. Dis.* 5, 279–313.
- Boechat, A.L., Kaihama, G.H., Politi, M.J., Lépine, F., Baldini, R.L., 2013.** “A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*.” *PLoS One* 8.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014.** “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.” *Bioinformatics* 30, 2114.
- Booth, I.R., 2014.** “Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology.” *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 16–22.
- Booth, I.R., Blount, P., 2012.** “The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves.” *J. Bacteriol.* 194, 4802–9.
- Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., Filloux, A., 2010.** “Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis.” *Mol. Microbiol.* 76, 1427–43.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010.** “*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix.” *Mol. Microbiol.* 75, 827–842.
- Bos, J., Zhang, Q., Vyawahare, S., Rogers, E., Rosenberg, S.M., Austin, R.H., 2015.** “Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 178–83.
- Bouffartigues, E., Duchesne, R., Bazire, A., Simon, M., Maillot, O., Dufour, A., Feuilloley, M., Orange, N., Chevalier, S., 2014.** “Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX.” *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 193–200.
- Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Chevalier, S., 2012.** “Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced.” *J. Bacteriol.* 194, 4301–4311.
- Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Fito-Boncompagni, L., Taupin, L., Maillot, O., Groboillot, A., Duclairoir, C.P., Orange, N., Feuilloley, M., Dufour, A., Chevalier, S., 2011.** “The Major Outer Membrane Protein Oprf is Required for Rhamnolipid Production in *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol. Parasitol.*
- Bouffartigues, E., Moscoso, J.A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompagni, L., Gicquel, G., Maillot, O., Bénard, M., Bazire, A., Brenner-Weiss, G., Lesouhaitier, O., Lerouge, P., Dufour, A., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Overhage, J., Filloux, A., Chevalier, S., 2015.** “The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level.” *Front. Microbiol.* 6, 630.
- Bouillet, S., Ba, M., Houot, L., Iobbi-Nivol, C., Bordi, C., 2019.** “Connected partner-switches control the life style of *Pseudomonas aeruginosa* through RpoS regulation.” *Sci. Rep.* 9, 6496.
- Braun, V., Endriß, F., 2007.** “Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins.” *BioMetals* 20, 219–231.
- Brazas, M.D., Hancock, R.E.W., 2005.** “Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in

- Pseudomonas aeruginosa*.” Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3222–7.
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E.W., 2011.** “*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance.” Trends Microbiol. 19, 419–26.
- Brencic, A., Lory, S., 2009.** “Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA.” Mol. Microbiol. 72, 612–632.
- Brinkman, F.S., Schoofs, G., Hancock, R.E., De Mot, R., 1999.** “Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*.” J. Bacteriol. 181, 4746–54.
- Broder, U.N., Jaeger, T., Jenal, U., 2017.** “LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*.” Nat. Microbiol. 2, 16184.
- Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A., Yahr, T.L., 2009.** “Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system.” J. Bacteriol. 191, 3811–21.
- Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.-M., Taffin de Givenchy, E., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., Bellon-Fontaine, M.-N., 2015.** “Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces.” Colloids Surfaces B Biointerfaces 131, 59–66.
- Burgener, E.B., Sweere, J.M., Bach, M.S., Secor, P.R., Haddock, N., Jennings, L.K., Marvig, R.L., Johansen, H.K., Rossi, E., Cao, X., Tian, L., Nedelec, L., Molin, S., Bollyky, P.L., Milla, C.E., 2019.** “Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis.” Sci. Transl. Med. 11, eaau9748.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., O’Gara, F., 2006.** “Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis.” Microbiology 152, 405–418.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S., Wozniak, D.J., 2009.** “Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production.” Mol. Microbiol. 73, 622–638.
- C**ailla, O., Rossier, C., Perron, K., 2007. “A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 189, 4561–8.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., Brüssow, H., 2003.** “Prophage genomics.” Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 238–76, table of contents.
- Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.-C., Lloubes, R., 2002.** “Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity.” J. Bacteriol. 184, 754–9.
- Castang, S., Dove, S.L., 2012.** “Basis for the Essentiality of H-NS Family Members in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 194, 5101–5109.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B.P., Faure, K., 2009.** “Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands.” Infect. Immun. 77, 2065–75.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., Cornelis, P., 2018.** “Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*.” Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., Cornelis, P., 2017.** “Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins.” FEMS Microbiol. Rev.

- Chew, S.C., Kundukad, B., Seviour, T., van der Maarel, J.R.C., Yang, L., Rice, S.A., Doyle, P., Kjelleberg, S., 2014. "Dynamic Remodeling of Microbial Biofilms by Functionally Distinct Exopolysaccharides." *MBio* 5.
- Chuang, S.K., Vrla, G.D., Fröhlich, K.S., Gitai, Z., 2019. "Surface association sensitizes *Pseudomonas aeruginosa* to quorum sensing." *Nat. Commun.* 10, 4118.
- Chun, K.T., Edenberg, H.J., Kelley, M.R., Goebel, M.G., 1997. "Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA." *Yeast* 13, 233–240.
- Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., 2012. "Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype." *Curr. Issues Mol. Biol.* 14, 47–70.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. "The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS Pathog.* 7.
- Comeau, A.M., Hatfull, G.F., Krisch, H.M., Lindell, D., Mann, N.H., Prangishvili, D., 2008. "Exploring the prokaryotic virosphere." *Res. Microbiol.* 159, 306–313.
- Cooke, A.C., Nello, A. V., Ernst, R.K., Schertzer, J.W., 2019. "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm membrane vesicles supports multiple mechanisms of biogenesis." *PLoS One* 14, e0212275.
- Cornelis, P., Dingemans, J., 2013. "*Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections." *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 75.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* (80-.). 284, 1318–22.
- Crabbé, A., Pycke, B., Van Houdt, R., Monsieurs, P., Nickerson, C., Leys, N., Cornelis, P., 2010. "Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation." *Environ. Microbiol.* 12, 1545–1564.
- Crabbé, A., Schurr, M.J., Monsieurs, P., Morici, L., Schurr, J., Wilson, J.W., Ott, C.M., Tsapraillis, G., Pierson, D.L., Stefanyshyn-Piper, H., Nickerson, C.A., 2011. "Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen." *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1221–30.
- D**'Hérelle, F., 1917. "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques." *Comptes rendus Hebd. l'Académie des Sci.* 373–375.
- Darwin, A.J., 2005. "The phage-shock-protein response." *Mol. Microbiol.*
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2003. "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J. Bacteriol.* 185, 1027–36.
- de Bentzmann, S., Giraud, C., Bernard, C.S., Calderon, V., Ewald, F., Plésiat, P., Nguyen, C., Grunwald, D., Attree, I., Jeannot, K., Fauvarque, M.-O., Bordi, C., 2012. "Unique Biofilm Signature, Drug Susceptibility and Decreased Virulence in *Drosophila* through the *Pseudomonas aeruginosa* Two-Component System PprAB." *PLoS Pathog.* 8, e1003052.
- De Wulf, P., McGuire, A.M., Liu, X., Lin, E.C.C., 2002. "Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 277, 26652–61.
- Diepouis, G., Ducret, V., Caille, O., Perron, K., 2012. "The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS One* 7.
- Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." *Environ. Microbiol.* 8, 1095–1104.

- Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., An, S.-W., Xu, J.-L., Zhang, L.-H., 2008.** “A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Commun. Integr. Biol.* 1, 88–96.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., Lejeune, P., 1999.** “Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation.” *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 169–175.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., Berekzi, N., Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., Berekzi, N., 2017.** “A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms.” *Viruses* 9, 50.
- Dötsch, A., Klawonn, F., Jarek, M., Scharfe, M., Blöcker, H., Häussler, S., 2010.** “Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*.” *BMC Genomics* 11, 234.
- Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2015.** “Lantibiotic resistance.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 171–91.
- Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H., 2007.** “The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections.” *Drugs* 67, 351–368.
- Dubois-Brissonnet, F., Malgrange, C., Guérin-Méchin, L., Heyd, B., Leveau, J., 2000.** “Effect of temperature and physiological state on the fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Int. J. Food Microbiol.* 55, 79–81.
- Duchêne, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B.U., Domdey, H., 1988.** “Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene.” *J. Bacteriol.* 170, 155–62.
- Duchesne, R., Bouffartigues, E., Oxaran, V., Maillot, O., Bénard, M., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Chevalier, S., 2013.** “A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition.” *J. Proteomics* 94, 451–459.

Edwards, M.D., Black, S., Rasmussen, T., Rasmussen, A., Stokes, N.R., Stephen, T.-L., Miller, S., Booth, I.R., 2012. “Characterization of three novel mechanosensitive channel activities in *Escherichia coli*.” *Channels (Austin)*. 6, 272–81.

El Khoury, M., Swain, J., Sautrey, G., Zimmermann, L., Van Der Smissen, P., Décout, J.-L., Mingeot-Leclercq, M.-P., 2017. “Targeting Bacterial Cardiolipin Enriched Microdomains: An Antimicrobial Strategy Used by Amphiphilic Aminoglycoside Antibiotics.” *Sci. Rep.* 7, 10697.

Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M.F., Wine, E., Feldman, M.F., 2016. “LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*.” *MBio* 7.

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., Sorek, R., 2017. “Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions.” *Nature* 541, 488–493.

Errington, J., 2015. “Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix.” *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 241–248.

Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D., 2005. “Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections.” *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333–1341.

Fenton, A.K., Gerdes, K., 2013. “Direct interaction of FtsZ and MreB is required for septum synthesis and cell division in *Escherichia coli*.” *EMBO J.* 32, 1953.

Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013. “ β -Lactams: chemical structure, mode of action and

- mechanisms of resistance.” *Rev. Med. Microbiol.* 24, 7–17.
- Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., 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, 3372–82.
- Fernández, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W.J., Hancock, R.E.W., 2012.** “The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6212–22.
- Filloux, A., 2011.** “Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function.” *Front. Microbiol.* 2, 155.
- Firoved, A.M., Boucher, J.C., Deretic, V., 2002.** “Global genomic analysis of AlgU (σ)-dependent promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis.” *J. Bacteriol.* 184, 1057–1064.
- Fito-Boncompote, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Véron, W., Taupin, L., Toussaint, B., Cornelis, P., Wei, Q., Shioya, K., Déziel, E., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., Chevalier, S., 2011.** “Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF.” *Infect. Immun.* 79, 1176–1186.
- Fléchar, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., Lagy, C., Maillot, O., Tortuel, D., Azuama, C.O., Clamens, T., Duclairoir-Poc, C., Catel-Ferreira, M., Gicquel, G., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., Heipieper, H.J., Groleau, M.C., Déziel, É., Cornelis, P., Chevalier, S., 2018.** “The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Sci. Rep.* 8.
- Fortier, L.C., Sekulovic, O., 2013.** “Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens.” *Virulence* 4, 354–365.
- Fowler, P.W., Hélie, J., Duncan, A., Chavent, M., Koldsø, H., Sansom, M.S.P., 2016.** “Membrane stiffness is modified by integral membrane proteins.” *Soft Matter* 12, 7792–7803.
- Francis, V.I., Stevenson, E.C., Porter, S.L., 2017.** “Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.” *FEMS Microbiol. Lett.*
- Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., Howell, P.L., 2011.** “Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl.” *Front. Microbiol.* 2, 167.
- Friedman, L., Kolter, R., 2004.** “Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix.” *J. Bacteriol.* 186, 4457–65.
- Friedman, L., Kolter, R., 2003.** “Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms.” *Mol. Microbiol.* 51, 675–690.
- Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Jones, A.K., Fulcher, N.B., Urbanowski, M.L., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010.** “The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms.” *J. Bacteriol.* 192, 3553–64.
- Fulcher, N.B., Holliday, P.M., Klem, E., Cann, M.J., Wolfgang, M.C., 2010.** “The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity.” *Mol. Microbiol.* 76, 889–904.
- Fuqua, C., 2006.** “The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: An orphan claims its identity.” *J. Bacteriol.*
- G**allagher, L.A., Shendure, J., Manoil, C., 2011. “Genome-scale identification of resistance functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq.” *MBio* 2, e00315-10.

- Gallant, J., Palmer, L., Pao, C.C., 1977.** “Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells.” *Cell* 11, 181–5.
- Galloway, D.R., 1991.** “*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments.” *Mol. Microbiol.* 5, 2315–2321.
- Gasol, J.M., Del Giorgio, P.A., 2000.** “Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities.” *Sci. Mar.* 64, 197–224.
- Gellatly, S.L., Needham, B., Madera, L., Trent, M.S., Hancock, R.E.W., 2012.** “The *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ two-component regulatory system is induced upon interaction with epithelial cells and controls cytotoxicity and inflammation.” *Infect. Immun.* 80, 3122–31.
- Gessard, C., 1882.** “Sur la coloration bleue et verte des linges à pansements.” *Comptes-rendus Hebd. des séances l’Académie des Sci.* 94, 536–538.
- Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011.** “Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture.” *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5238–5246.
- Ghequire, M.G.K., De Mot, R., 2014.** “Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*.” *FEMS Microbiol. Rev.*
- Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Bénard, M., Cornelis, P., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Déziel, E., Chevalier, S., 2013.** “The extra-cytoplasmic function sigma factor SigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*.” *PLoS One* 8.
- Gilbert, K.B., Kim, T.H., Gupta, R., Greenberg, E.P., Schuster, M., 2009.** “Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR.” *Mol. Microbiol.* 73, 1072–1085.
- Gilboa-Garber, N., 1988.** “*Pseudomonas aeruginosa* Lectins as a Model for Lectin Production, Properties, Applications and Functions.” *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Ser. A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology.* 270, 3–15.
- Giraud, C., Bernard, C.S., Calderon, V., Yang, L., Filloux, A., Molin, S., Fichant, G., Bordi, C., Bentzmann, S. de, 2011.** “The PprA–PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone–usher pathway system assembling fimbriae.” *Environ. Microbiol.* 13, 666–683.
- Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B.H., Robinson, J.B., 1999.** “Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility.” *J. Bacteriol.* 181, 1623–9.
- Glover, W.A., Yang, Y., Zhang, Y., 2009.** “Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in *Escherichia coli*.” *PLoS One* 4, e7316.
- Gooderham, W.J., Hancock, R.E.W., 2009.** “Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*.” *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 279–294.
- Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J.M., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.N., 2017.** “Proteomic response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhering to solid surfaces.” *Front. Microbiol.* 8.
- Guragain, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., Reutlinger, I., Patrauchan, M.A., 2013.** “Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility.” *Cell Calcium* 54, 350–61.
- Gutu, A.D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M.K., Jacobs, M.A., Haugen, E., Kaul, R.K., Johansen, H.K., Høiby, N., Moskowitz, S.M., 2013.** “Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2204–15.

- Ha, D.-G., O'Toole, G.A., 2015.** "c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review." *Microbiol. Spectr.* 3.
- Haeusser, D.P., Margolin, W., 2016.** "Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring." *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 305–19.
- Hancock, R.E.W., Carey, A.M., 1979.** "Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins." *J. Bacteriol.* 140, 902–910.
- Haseltine, W.A., Block, R., 1973.** "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1564–8.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S. V, Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., 2002.** "Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1425–43.
- Haswell, E.S., Phillips, R., Rees, D.C., 2011.** "Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it?" *Structure* 19, 1356–69.
- Hay, I.D., Lithgow, T., 2019.** "Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy." *EMBO Rep.* e47427.
- Hay, I.D., Wang, Y., Moradali, M.F., Rehman, Z.U., Rehm, B.H.A., 2014.** "Genetics and regulation of bacterial alginate production." *Environ. Microbiol.* 16, 2997–3011.
- Heacock-Kang, Y., Sun, Z., Zarzycki-Siek, J., McMillan, I.A., Norris, M.H., Bluhm, A.P., Cabanas, D., Fogen, D., Vo, H., Donachie, S.P., Borlee, B.R., Sibley, C.D., Lewenza, S., Schurr, M.J., Schweizer, H.P., Hoang, T.T., 2017.** "Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture." *Mol. Microbiol.* 106, 976–985.
- Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., Mestecky, J.F., 1990.** "Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase." *J. Immunol.* 144, 2253–7.
- Helmann, J.D., 2002.** "The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." *Adv. Microb. Physiol.* 46, 47–110.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000.** "Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat." *Microbiology* 146, 2395–2407.
- Hill, D.F., Short, N.J., Perham, R.N., Petersen, G.B., 1991.** "DNA sequence of the filamentous bacteriophage Pf1." *J. Mol. Biol.* 218, 349–364.
- Ho, B.T., Dong, T.G., Mekalanos, J.J., 2014.** "A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System." *Cell Host Microbe* 15, 9–21.
- Hoang, H.H., Nickerson, N.N., Lee, V.T., Kazimirova, A., Chami, M., Pugsley, A.P., Lory, S., 2011.** "Outer Membrane Targeting of *Pseudomonas aeruginosa* Proteins Shows Variable Dependence on the Components of Bam and Lol Machineries." *MBio* 2, e00246-11.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., Schweizer, H.P., 2000.** "Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains." *Plasmid* 43, 59–72.
- Høyland-Kroghsbo, N.M., Maerkedahl, R.B., Svenningsen, S. Lo, 2013.** "A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism." *MBio* 4, e00362-12.
- Huang, H., Shao, X., Xie, Y., Wang, T., Zhang, Y., Wang, X., Deng, X., 2019.** "An integrated genomic

regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*." Nat. Commun. 10, 2931.

Hui, J.G.K., Mai-Prochnow, A., Kjelleberg, S., McDougald, D., Rice, S.A., 2014. "Environmental cues and genes involved in establishment of the superinfective Pf4 phage of *Pseudomonas aeruginosa*." Front. Microbiol. 5.

Imperi, F., Ciccocanti, F., Perdomo, A.B., Tiburzi, F., Mancone, C., Alonzi, T., Ascenzi, P., Piacentini, M., Visca, P., Fimia, G.M., 2009. "Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen." Proteomics 9, 1901–1915.

Inclan, Y.F., Persat, A., Greninger, A., Von Dollen, J., Johnson, J., Krogan, N., Gitai, Z., Engel, J.N., 2016. "A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol. Microbiol. 101, 590–605.

Irie, Y., Borlee, B.R., O'Connor, J.R., Hill, P.J., Harwood, C.S., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. "Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 20632–6.

Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T., Parsek, M.R., 2010. "*Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA." Mol. Microbiol. 78, 158–172.

Iscla, I., Blount, P., 2012. "Sensing and responding to membrane tension: the bacterial MscL channel as a model system." Biophys. J. 103, 169–74.

Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., 2004. "Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation." J. Bacteriol. 186, 4466–75.

Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V, Manoil, C., 2003. "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 14339–44.

Jefferson, K.K., 2004. "What drives bacteria to produce a biofilm?" FEMS Microbiol. Lett. 236, 163–173.

Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D.J., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2015. "Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 11353.

Jones, A.K., Fulcher, N.B., Balzer, G.J., Urbanowski, M.L., Pritchett, C.L., Schurr, M.J., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010. "Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU Regulon through *mucA* Mutation Inhibits Cyclic AMP/Vfr Signaling." J. Bacteriol. 192, 5709–5717.

Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., Limoli, D.H., Harrison, J.J., Parsek, M.R., White, P., Wozniak, D.J., 2014. "ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS Pathog. 10.

Jones, C.J., Ryder, C.R., Mann, E.E., Wozniak, D.J., 2013. "AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon." J. Bacteriol. 195, 1637–44.

Jones, L.J., Carballido-López, R., Errington, J., 2001. "Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*." Cell 104, 913–22.

Joo, H.-S., Otto, M., 2012. "Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens." Chem. Biol. 19, 1503–13.

- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., Hultgren, S.J., 2008. "Morphological plasticity as a bacterial survival strategy." *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 162–168.
- K**akuda, T., Koide, Y., Sakamoto, A., Takai, S., 2012. "Characterization of two putative mechanosensitive channel proteins of *Campylobacter jejuni* involved in protection against osmotic downshock." *Vet. Microbiol.* 160, 53–60.
- Kang, Y., Nguyen, D.T., Son, M.S., Hoang, T.T., 2008. "The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* β -oxidation operon." *Microbiology* 154, 1584–1598.
- Keen, E.C., 2015. "A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology." *Bioessays* 37, 6–9.
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., Korkeala, H., 2016. "Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*." *Front. Microbiol.* 7, 1151.
- Khalifa, A.B.H., Moissenet, D., Thien, H.V., Khedher, M., 2011. "Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations." *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 69, 393–403.
- Khanam, S., Guragain, M., Lenaburg, D.L., Kubat, R., Patrauchan, M.A., 2017. "Calcium induces tobramycin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by regulating RND efflux pumps." *Cell Calcium* 61, 32–43.
- Kilmury, S.L.N., Burrows, L.L., 2016. "Type IV pilins regulate their own expression via direct intramembrane interactions with the sensor kinase PilS." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6017–6022.
- Kim, E.J., Yu, H.J., Lee, J.H., Kim, J.-O., Han, S.H., Yun, C.-H., Chun, J., Nair, G.B., Kim, D.W., 2017. "Replication of *Vibrio cholerae* classical CTX phage." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 2343–2348.
- Kim, K., Kim, Y.U., Koh, B.H., Hwang, S.S., Kim, S.-H., Lépine, F., Cho, Y.-H., Lee, G.R., 2010. "HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway." *Immunology* 129, 578–88.
- Kim, S.-K., Lee, J.-H., 2016. "Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Microbiol.* 54, 71–85.
- King, J.D., Kocíncová, D., Westman, E.L., Lam, J.S., 2009. "Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Innate Immun.* 15, 261–312.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. "Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Mol. Microbiol.* 50, 61–68.
- Knezevic, P., Voet, M., Lavigne, R., 2015. "Prevalence of Pfl-like (pro)phage genetic elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates." *Virology* 483, 64–71.
- Koebnik, R., 2005. "TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule?" *Trends Microbiol.* 13, 343–347.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.C., 2000. "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." *J. Bacteriol.* 182, 5990–6.
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M.G., Shen, L., Duan, K., 2013. "Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS." *Mol. Microbiol.* 88, 784–797.
- Kong, W., Zhao, J., Kang, H., Zhu, M., Zhou, T., Deng, X., Liang, H., 2015. "ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Nucleic Acids Res.*

- Koprowski, P., Grajkowski, W., Balcerzak, M., Filipiuk, I., Fabczak, H., Kubalski, A., 2015.** “Cytoplasmic domain of MscS interacts with cell division protein FtsZ: A possible non-channel function of the mechanosensitive channel in *Escherichia coli*.” PLoS One 10.
- Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000.** “Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.” Antimicrob. Agents Chemother. 44, 3249–56.
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016.** “Aminoglycosides: An Overview.” Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6.
- Kreamer, N.N., Costa, F., Newman, D.K., 2015.** “The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance.” MBio 6, e02549.
- Kreamer, N.N.K., Wilks, J.C., Marlow, J.J., Coleman, M.L., Newman, D.K., 2012.** “BqsR/BqsS constitute a two-component system that senses extracellular Fe(II) in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 194, 1195–204.
- Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P., 2009.** “Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay,” in: Bacteriophages. Humana Press, pp. 69–76.
- Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A., Gerdes, K., 2003.** “Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*.” EMBO J. 22, 5283–92.
- Kulasekara, H.D., 2014.** “Transposon mutagenesis.” Methods Mol. Biol. 1149, 501–519.
- Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., Lory, S., 2005.** “A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes.” Mol. Microbiol. 55, 368–380.
- Kulkarni, H.M., Jagannadham, M. V., 2014.** “Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria.” Microbiology 160, 2109–2121.
- Kung, C., Martinac, B., Sukharev, S., 2010.** “Mechanosensitive Channels in Microbes.” Annu. Rev. Microbiol. 64, 313–329.
- Kuo, T.-T., Lin, Y.-H., Huang, C.-M., Chang, S.-F., Dai, H., Feng, T.-Y., 1987.** “The Lysogenic Cycle of the Filamentous Phage Cfl1 from *Xanthomonas campestris* pv. citri.” Virology 156, 305–312.
- Lambert, M.P., Neuhaus, F.C., 1972.** “Mechanism of d-Cycloserine Action: Alanine Racemase from *Escherichia coli* W.” J. Bacteriol. 110, 978.
- Lampe, D.J., Akerley, B.J., Rubin, E.J., Mekalanos, J.J., Robertson, H.M., 1999.** “Hyperactive transposase mutants of the *Himar1* mariner transposon.” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 11428–33.
- LaSarre, B., Federle, M.J., 2013.** “Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens.” Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 73–111.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A., 1996.** “A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS.” Mol. Microbiol. 21, 1137–1146.
- Lau, C.H.-F., Krahn, T., Gilmour, C., Mullen, E., Poole, K., 2015.** “AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*.” Microbiologyopen 4, 121.
- Laughlin, R.S., Musch, M.W., Hollbrook, C.J., Rocha, F.M., Chang, E.B., Alverdy, J.C., 2000.** “The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis.” Ann. Surg. 232, 133–42.

- Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, M.H., Lee, J., 2014. "ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production." *Microbiol. Res.* 169, 888–896.
- Lee, J.-Y., Chung, E.S., Na, I.Y., Kim, H., Shin, D., Ko, K.S., 2014. "Development of colistin resistance in *pmrA*-, *phoP*-, *parR*- and *cprR*-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2966–2971.
- Lee, J., Attila, C., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., Wood, T.K., 2009. "Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence." *Microb. Biotechnol.* 2, 75–90.
- Lee, J., Zhang, L., 2014. "The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*." *Protein Cell* 6, 26–41.
- Lee, V.T., Mawish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007. "A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production." *Mol. Microbiol.* 65, 1474–1484.
- Lee, Y., Song, S., Sheng, L., Zhu, L., Kim, J.S., Wood, T.K., 2018. "Substrate binding protein DppA1 of ABC transporter DppBCDF increases biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting PF5 prophage lysis." *Front. Microbiol.* 9.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., Mekalanos, J.J., 2009. "Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4154–9.
- Lenney, W., Gilchrist, F.J., 2011. "*Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production." *Eur. Respir. J.* 37, 482–3.
- LeRoux, M., Kirkpatrick, R.L., Montauti, E.I., Tran, B.Q., Peterson, S.B., Harding, B.N., Whitney, J.C., Russell, A.B., Traxler, B., Goo, Y.A., Goodlett, D.R., Wiggins, P.A., Mougous, J.D., 2015. "Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*." *Elife* 4.
- Levina, N., Tötö Temeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., Booth, I.R., 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity, *The EMBO Journal*.
- Lewenza, S., 2013. "Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*." *Front. Microbiol.* 4, 21.
- Lewis, K., 2010. "Persister Cells." *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Li, Y., Bai, F., Xia, H., Zhuang, L., Xu, H., Jin, Y., Zhang, X., Bai, Y., Qiao, M., 2015. "A novel regulator PA5022 (*aefA*) is involved in swimming motility, biofilm formation and elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiol. Res.* 176, 14–20.
- Li, Y., Liu, X., Tang, K., Wang, P., Zeng, Z., Guo, Y., Wang, X., 2019. "Excisionase in Pf filamentous prophage controls lysis-lysogeny decision-making in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol. Microbiol.* 111, 495–513.
- Lin, C.-T., Huang, Y.-J., Chu, P.-H., Hsu, J.-L., Huang, C.-H., Peng, H.-L., 2006. "Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *Res. Microbiol.* 157, 169–175.
- Liu, W., Li, M., Jiao, L., Wang, P., Yan, Y., 2017. "PmrA/PmrB Two-Component System Regulation of *lipA* Expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *Front. Microbiol.* 8, 2690.
- Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., Lamont, I.L., 2014. "Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: Stress responses, iron transport, and pathogenicity." *FEMS Microbiol. Rev.*
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., Buttner, M.J., 1994. "Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7573–7.

- Luo, Y., Zhao, K., Baker, A.E., Kuchma, S.L., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., Wong, G.C.L., O'Toole, G.A., 2015. "A Hierarchical Cascade of Second Messengers Regulates *Pseudomonas aeruginosa* Surface Behaviors." *MBio* 6.
- Lutkenhaus, J., 2007. "Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring." *Annu. Rev. Biochem.* 76, 539–562.
- M**a, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. "Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." *PLoS Pathog.* 5, e1000354.
- Macfarlane, E.L.A., Kwasnicka, A., Hancock, R.E.W., 2000. "Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides." *Microbiology* 146, 2543–2554.
- Macfarlane, E.L.A., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., Hancock, R.E.W., 1999. "PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance." *Mol. Microbiol.* 34, 305–316.
- Mai-Prochnow, A., Hui, J.G.K., Kjelleberg, S., Rakonjac, J., McDougald, D., Rice, S.A., 2015. "Big things in small packages: The genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host." *FEMS Microbiol. Rev.*
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., de Mendoza, D., 2004. "Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors." *J. Bacteriol.* 186, 6681–8.
- Margolin, W., 2009. "Sculpting the bacterial cell." *Curr. Biol.* 19, R812-22.
- Margolin, W., 2005. "FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 862–71.
- Martínez-Granero, F., Redondo-Nieto, M., Vesga, P., Martín, M., Rivilla, R., 2014. "AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaptation in *P. fluorescens* F113." *BMC Genomics* 15, 237.
- Martínez, E., Campos-Gómez, J., 2016. "Pf Filamentous Phage Requires UvrD for Replication in *Pseudomonas aeruginosa*." *mSphere* 1.
- Masuda, N., Church, G.M., 2003. "Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 48, 699–712.
- Masuda, N., Church, G.M., 2002. "*Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA." *J. Bacteriol.* 184, 6225–34.
- Matsuyama, B.Y., Krasteva, P. V., Baraquet, C., Harwood, C.S., Sondermann, H., Navarro, M.V.A.S., 2016. "Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E209-18.
- Maunder, E., Welch, M., 2017. "Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation." *FEMS Microbiol. Lett.* 364.
- Maura, D., Hazan, R., Kitao, T., Ballok, A.E., Rahme, L.G., 2016. "Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, Mvfr." *Sci. Rep.* 6, 34083.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal." *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 39–50.
- McElroy, K.E., Hui, J.G.K., Woo, J.K.K., Luk, A.W.S., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Rice, S.A., Thomas, T., 2014. "Strain-specific parallel evolution drives short-term diversification during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E1419–E1427.

- McGuffie, B.A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., 2016.** “ σ Factor and Anti- σ Factor That Control Swarming Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 198, 755–765.
- McLaggan, D., Jones, M.A., Gouesbet, G., Levina, N., Lindey, S., Epstein, W., Booth, I.R., 2002.** “Analysis of the *kefA2* mutation suggests that KefA is a cation-specific channel involved in osmotic adaptation in *Escherichia coli*.” Mol. Microbiol. 43, 521–536.
- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2006.** “Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 188, 3995–4006.
- McPhee, J.B., Lewenza, S., Hancock, R.E.W., 2003.** “Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*.” Mol. Microbiol. 50, 205–217.
- Meighen, E.A., 1993.** “Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes.” FASEB J. 7, 1016–1022.
- Mern, D.S., Ha, S.W., Khodaverdi, V., Gliese, N., Gorisch, H., 2010.** “A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators.” Microbiology 156, 1505–1516.
- Merrick, M.J., 1993.** “In a class of its own? The RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N).” Mol. Microbiol. 10, 903–909.
- Michalopoulos, A.S., Livaditis, I.G., Gougoutas, V., 2011.** “The revival of fosfomycin.” Int. J. Infect. Dis. 15, e732–e739.
- Michel-Briand, Y., Baysse, C., 2002.** “The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*.” Biochimie 84, 499–510.
- Michel, B., 2005.** “After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us.” PLoS Biol. 3, e255.
- Miyayama, Y., Yanagihara, K., Kaku, N., Harada, Y., Yamada, K., Nagaoka, K., Morinaga, Y., Akamatsu, N., Matsuda, J., Izumikawa, K., Kohrogi, H., Kohno, S., 2016.** “*Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia among Immunocompetent and Immunocompromised Patients: Relation to Initial Antibiotic Therapy and Survival.” Jpn. J. Infect. Dis. 69, 91–96.
- Mikheenko, A., Pribelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., Gurevich, A., 2018.** “Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG.” Bioinformatics 34, i142.
- Mitchell, A.M., Silhavy, T.J., 2019.** “Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity.” Nat. Rev. Microbiol. 17, 417–428.
- Mooij, M.J., Drenkard, E., Llamas, M.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M., Ausubel, F.M., Bitter, W., 2007.** “Characterization of the integrated filamentous phage Pf5 and its involvement in small-colony formation.” Microbiology 153, 1790–1798.
- Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A., 2017.** “*Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence.” Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 39.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964.** “Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol.” J. Lipid Res. 5, 600–608.
- Moscoso, J.A., Jaeger, T., Valentini, M., Hui, K., Jenal, U., Filloux, A., 2014.** “The Diguanylate Cyclase SadC Is a Central Player in Gac/Rsm-Mediated Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 196, 4081–4088.
- Moskowitz, S.M., Brannon, M.K., Dasgupta, N., Pier, M., Sgambati, N., Miller, A.K., Selgrade, S.E., Miller, S.I., Denton, M., Conway, S.P., Johansen, H.K., Høiby, N., 2012.** “PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients.” Antimicrob. Agents Chemother. 56, 1019–30.

- Mulcahy, H., O'Callaghan, J., O'Grady, E.P., Adams, C., O'Gara, F., 2006.** "The posttranscriptional regulator RsmA plays a role in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and human airway epithelial cells by positively regulating the type III secretion system." *Infect. Immun.* 74, 3012–5.
- Muller, C., Plésiat, P., Jeannot, K., 2011.** "A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1211–21.
- Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J., 2010.** "DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics." *Curr. Genomics* 11, 115–128.
- Naismith, J.H., Booth, I.R., 2012.** "Bacterial mechanosensitive channels MscS: evolution's solution to creating sensitivity in function." *Annu. Rev. Biophys.* 41, 157–77.
- Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., Hayashi, T., 2000.** "The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage." *Mol. Microbiol.* 38, 213–231.
- Navare, A.T., Chavez, J.D., Zheng, C., Weisbrod, C.R., Eng, J.K., Siehnel, R., Singh, P.K., Manoil, C., Bruce, J.E., 2015.** "Probing the protein interaction network of *Pseudomonas aeruginosa* cells by chemical cross-linking mass spectrometry." *Structure* 23, 762–73.
- Nazik, H., Joubert, L.M., Secor, P.R., Sweere, J.M., Bollyky, P.L., Sass, G., Cegelski, L., Stevens, D.A., 2017.** "*Pseudomonas* phage inhibition of *Candida albicans*." *Microbiol. (United Kingdom)* 163, 1568–1577.
- Nestorovich, E.M., Sugawara, E., Nikaido, H., Bezrukov, S.M., 2006.** "*Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel." *J. Biol. Chem.* 281, 16230–7.
- Niegowski, D., Eshaghi, S., 2007.** "The CorA family: Structure and function revisited." *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2564–2574.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K., 2010.** "TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function." *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60.
- Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., Kohno, T., Sawada, N., Himi, T., Kojima, T., 2014.** "*Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells." *Respir. Res.* 15, 21.
- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Rasmussen, G.T., Abdalla, M.Y., Denning, G.M., Britigan, B.E., 2003.** "The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells." *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 285, L1077–L1086.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998.** "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis." *Mol. Microbiol.* 28, 449–461.
- Okshevsky, M., Meyer, R.L., 2015.** "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms." *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 341–352.
- Okuda, S., Sherman, D.J., Silhavy, T.J., Ruiz, N., Kahne, D., 2016.** "Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model." *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 337–345.
- Osanai, T., Sato, S., Tabata, S., Tanaka, K., 2005.** "Identification of Pama as a PII-binding membrane protein important in nitrogen-related and sugar-catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *J. Biol. Chem.* 280, 34684–90.
- Osanai, T., Tanaka, K., 2007.** "Keeping in Touch with PII: PII-Interacting Proteins in Unicellular Cyanobacteria." *Plant Cell Physiol.* 48, 908–914.

- P**amp, S.J., Sternberg, C., Tolker-Nielsen, T., 2009. "Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy." *Cytom. Part A* 75A, 90–103.
- Passos da Silva, D., Matwchuk, M.L., Townsend, D.O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2019. "The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix." *Nat. Commun.* 10, 2183.
- Penner, J.C., Ferreira, J.A.G., Secor, P.R., Sweere, J.M., Birukova, M.K., Joubert, L.M., Haagensen, J.A.J., Garcia, O., Malkovskiy, A. V., Kaber, G., Nazik, H., Manasherob, R., Spormann, A.M., Clemons, K. V., Stevens, D.A., Bollyky, P.L., 2016. "Pf4 bacteriophage produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *Aspergillus fumigatus* metabolism via iron sequestration." *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 1583–1594.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., Köhler, T., 2004. "CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Biol. Chem.* 279, 8761–8.
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., Gitai, Z., 2015. "Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 7563–7568.
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2011. "SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation." *J. Bacteriol.* 193, 6614–28.
- Petrova, O.E., Schurr, J.R., Schurr, M.J., Sauer, K., 2011. "The novel *Pseudomonas aeruginosa* two-component regulator BfmR controls bacteriophage-mediated lysis and DNA release during biofilm development through PhdA." *Mol. Microbiol.* 81, 767–783.
- Picardeau, M., 2010. "Transposition of fly mariner elements into bacteria as a genetic tool for mutagenesis." *Genetica* 138, 551–558.
- Pivetti, C.D., Yen, M.-R., Miller, S., Busch, W., Tseng, Y.-H., Booth, I.R., Saier, M.H., Jr., 2003. "Two families of mechanosensitive channel proteins." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 66–85, table of contents.
- Platt, M.D., Schurr, M.J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., Levesque, R.C., Fedynak, A., Brinkman, F.S.L., Schurr, J., Hwang, S.-H., Lau, G.W., Limbach, P.A., Rowe, J.J., Lieberman, M.A., Barraud, N., Webb, J., Kjelleberg, S., Hunt, D.F., Hassett, D.J., 2008. "Proteomic, Microarray, and Signature-Tagged Mutagenesis Analyses of Anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, Likely Representing Chronic, Late-Stage Cystic Fibrosis Airway Conditions." *J. Bacteriol.* 190, 2739–2758.
- Poole, K., 2011. "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max." *Front. Microbiol.* 2, 65.
- Poole, K., Gilmour, C., Farha, M.A., Mullen, E., Lau, C.H.-F., Brown, E.D., 2016. "Potentiation of Aminoglycoside Activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Targeting the AmgRS Envelope Stress-Responsive Two-Component System." *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3509–18.
- Poole, K., Hay, T., Gilmour, C., Fruci, M., 2019. "The aminoglycoside resistance-promoting AmgRS envelope stress-responsive two-component system in *Pseudomonas aeruginosa* is zinc-activated and protects cells from zinc-promoted membrane damage." *Microbiology* 165, 563–571.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., 2008. "Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol. Rev.*
- Pritchett, C.L., Little, A.S., Okkotsu, Y., Frisk, A., Cody, W.L., Covey, C.R., Schurr, M.J., 2015. "Expression analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component regulatory system." *J. Bacteriol.* 197, 736–48.
- Pritt, B., O'Brien, L., Winn, W., 2007. "Mucoid *Pseudomonas* in Cystic Fibrosis." *Am. J. Clin. Pathol.* 128, 32–34.

- Pukatzi, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J., 2006.** “Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1528–1533.
- Quénée, L., Lamotte, D., Polack, B., 2005.** “Combined *sacB* -based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Biotechniques* 38, 63–67.
- Rakonjac, J., 2012.** “Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications,” in: ELS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Rasamiravaka, T., Vandeputte, O., Jaziri, M., 2016.** “Procedure for Rhamnolipids Quantification Using Methylene-blue.” *Bio-Protocol* 6.
- Rawling, E.G., Brinkman, F.S., Hancock, R.E., 1998.** “Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association.” *J. Bacteriol.* 180, 3556–62.
- Reichhardt, C., Wong, C., Passos da Silva, D., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2018.** “CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing.” *MBio* 9, e01376-18.
- Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J., Cornelis, P., 2010.** “Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Microbiology* 156, 2597–2607.
- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., Daudé, D., 2018.** “Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective.” *Front. Pharmacol.* 9, 203.
- Rezuchova, B., Miticka, H., Homerova, D., Roberts, M., Kormanec, J., 2003.** “New members of the *Escherichia coli* σ^E regulon identified by a two-plasmid system.” *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 1–7.
- Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2009.** “The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage.” *ISME J.* 3, 271–282.
- Rodesney, C.A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B.J., Katira, P., Touhami, A., Gordon, V.D., 2017.** “Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 5906–5911.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., Foglino, M., 2000.** “Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many?” *Trends Microbiol.* 8, 498–504.
- Roghianian, M., Semsey, S., Løbner-Olesen, A., Jalalvand, F., 2019.** “(p)ppGpp-mediated stress response induced by defects in outer membrane biogenesis and ATP production promotes survival in *Escherichia coli*.” *Sci. Rep.* 9, 2934.
- Rojas, E.R., Huang, K.C., 2018.** “Regulation of microbial growth by turgor pressure.” *Curr. Opin. Microbiol.* 42, 62–70.
- Rostøl, J.T., Marraffini, L., 2019.** “(Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites.” *Cell Host Microbe* 25, 184–194.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., Roberts, M., 2006.** “Pushing the envelope: Extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens.” *Nat. Rev. Microbiol.*
- Rueggeberg, K.-G., Hay, A.G., Thompson, M.G., Franck, N., Toba, F.A., Bird, J.G., 2015.** “The lysis cassette of DLP12 defective prophage is regulated by RpoE.” *Microbiology* 161, 1683–1693.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012.** “Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control.” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a012427.

- Rybtke, M., Hultqvist, L.D., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015. “*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response.” *J. Mol. Biol.* 427, 3628–3645.
- Rybtke, M.T., Borlee, B.R., Murakami, K., Irie, Y., Hentzer, M., Nielsen, T.E., Givskov, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., 2012. “Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5060–9.
- S**akuragi, Y., Kolter, R., 2007. “Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 189, 5383–6.
- Schellhorn, H.E., Audia, J.P., Wei, L.I., Chang, L., 1998. “Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*.” *J. Bacteriol.* 180, 6283–91.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.” *Nat. Methods* 9, 671–5.
- Schnider-Keel, U., Lejbølle, K.B., Baehler, E., Haas, D., Keel, C., 2001. “The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0.” *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5683–93.
- Schultz, D.R., Miller, K.D., 1974. “Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors.” *Infect. Immun.* 10, 128–35.
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., Häußler, S., 2015. “Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk.” *PLOS Pathog.* 11, e1004744.
- Schumann, U., Edwards, M.D., Rasmussen, T., Bartlett, W., van West, P., Booth, I.R., 2010. “YbdG in *Escherichia coli* is a threshold-setting mechanosensitive channel with MscM activity.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12664–9.
- Schumann, W., 2017. “Regulation of the Heat Shock Response in Bacteria,” in: *Prokaryotic Chaperonins*. Springer, Singapore, pp. 21–36.
- Schurr, M.J., Yu, H., Boucher, J.C., Hibler, N.S., Deretic, V., 1995. “Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (σ^E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 177, 5670–5679.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., Greenberg, E.P., 2004. “The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing.” *Mol. Microbiol.* 51, 973–985.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P., 2003. “Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis.” *J. Bacteriol.* 185, 2066–79.
- Schwechheimer, C., Kuehn, M.J., 2015. “Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions.” *Nat. Rev. Microbiol.*
- Schwechheimer, C., Kulp, A., Kuehn, M.J., 2014. “Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content.” *BMC Microbiol.* 14.
- Scoffone, V.C., Chiarelli, L.R., Trespidi, G., Mentasti, M., Riccardi, G., Buroni, S., 2017. “*Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches.” *Front. Microbiol.* 8.
- Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., Arrigoni, A., Braun, K.R., Birkland, T.P., Lai, Y., Hallstrand, T.S., Bollyky, P.L., Singh, P.K., Parks, W.C., 2016. “Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory

Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo.” *Infect. Immun.* 85.

- Secor, P.R., Sass, G., Nazik, H., Stevens, D.A., 2017.** “Effect of acute predation with bacteriophage on intermicrobial aggression by *Pseudomonas aeruginosa*.” *PLoS One* 12.
- Secor, P.R., Sweere, J.M., Michaels, L.A., Malkovskiy, A. V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., Rajadas, J., Birnbaum, M.E., Arrigoni, A., Braun, K.R., Evanko, S.P., Stevens, D.A., Kaminsky, W., Singh, P.K., Parks, W.C., Bollyky, P.L., 2015.** “Filamentous bacteriophage promote biofilm assembly and function.” *Cell Host Microbe* 18, 549–559.
- Seyfzadeh, M., Keener, J., Nomura, M., 1993.** “spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11004–8.
- Shi, H., Bratton, B.P., Gitai, Z., Huang, K.C., 2018.** “How to Build a Bacterial Cell: MreB as the Foreman of *E. coli* Construction.” *Cell*.
- Simon, R., Prierer, U., Pühler, A., 1983.** “A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria.” *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Singh, N., Paknikar, K.M., Rajwade, J., 2019.** “RNA-sequencing reveals a multitude of effects of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.” *Environ. Sci. Nano* 6, 1812–1828.
- Sohlenkamp, C., Geiger, O., 2016.** “Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways.” *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 133–159.
- Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A.S., Backofen, R., Williams, P., Hüttenhofer, A., Haas, D., Bläsi, U., 2011.** “The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal.” *Mol. Microbiol.* 80, 868–885.
- Sorensen, R.U., Joseph, F., 1993.** “Phenazine Pigments in *Pseudomonas aeruginosa* Infection” *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen. Springer, Boston, MA, pp. 43–57.
- Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., Kaever, V., 2010.** “A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate.” *J. Microbiol. Methods* 81, 226–231.
- Sperandeo, P., Martorana, A.M., Polissi, A., 2017.** “The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria.” *J. Biol. Chem.* 292, 17981–17990.
- Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T., 2009.** “The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family.” *Mol. Microbiol.* 74, 557–581.
- Stiernagle, T., 2006.** “Maintenance of *C. elegans*.” *WormBook*.
- Stokes, N.R., Murray, H.D., Subramaniam, C., Gourse, R.L., Louis, P., Bartlett, W., Miller, S., Booth, I.R., 2003.** “A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15959–64.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002.** “A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C.” *Mol. Microbiol.* 46, 661–76.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002.** “Biofilms as Complex Differentiated Communities.” *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H.,**

- Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M. V., 2000. "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* 406, 959–64.
- Strehmel, J., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., 2015. "Sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14." *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1274–85.
- Sugawara, E., Nagano, K., Nikaido, H., 2012. "Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEBS J.* 279, 910–918.
- Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M., Nikaido, H., 2006. "*Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations." *J. Biol. Chem.* 281, 16220–9.
- Sweere, J.M., Van Belleghem, J.D., Ishak, H., Bach, M.S., Popescu, M., Sunkari, V., Kaber, G., Manasherob, R., Suh, G.A., Cao, X., de Vries, C.R., Lam, D.N., Marshall, P.L., Birukova, M., Katznelson, E., Lazzareschi, D. V., Balaji, S., Keswani, S.G., Hawn, T.R., Secor, P.R., Bollyky, P.L., 2019. "Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection." *Science* (80-). 363.
- T**ahrioui, A., Duchesne, R., Bouffartigues, E., Rodrigues, S., Maillot, O., Tortuel, D., Hardouin, J., Taupin, L., Groleau, M.-C., Dufour, A., Déziel, E., Brenner-Weiss, G., Feuilloley, M., Orange, N., Lesouhaitier, O., Cornelis, P., Chevalier, S., 2019. "Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation." *npj Biofilms Microbiomes* 5, 15.
- Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P., Persat, A., 2019. "*Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements." *Nat. Microbiol.* 4, 774–780.
- Tan, S.Y.-Y., Liu, Y., Chua, S.L., Vejborg, R.M., Jakobsen, T.H., Chew, S.C., Li, Y., Nielsen, T.E., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., Givskov, M., 2014. "Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound Iberin on *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6648–59.
- Tart, A.H., Blanks, M.J., Wozniak, D.J., 2006. "The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates." *J. Bacteriol.* 188, 6483–9.
- Taylor, P.K., Yeung, A.T.Y., Hancock, R.E.W., 2014. "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies." *J. Biotechnol.* 191, 121–130.
- Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M., Parsek, M.R., 2006. "Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Bacteriol.* 188, 7242–56.
- Tolker-Nielsen, T., Sternberg, C., 2011. "Growing and Analyzing Biofilms in Flow Chambers." *Curr. Protoc. Microbiol.* 21, 1B.2.1-1B.2.17.
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., Eberl, L., 2012. "Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix." *J. Proteome Res.* 11, 4906–4915.
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T., 2008. "The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 68, 1128–48.
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., Bramhill, D., 1998. "Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein." *J. Bacteriol.* 180, 3946–53.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A.L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N.K., Osvath, S.R., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, E.S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L.G., Cavaliere, R., Ahrens, C.H., Charles, I.G., Nomura, N., Eberl, L., Whitchurch, C.B., 2016.

“Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms.” Nat. Commun. 7.

Ultee, E., Ramijan, K., Dame, R.T., Briegel, A., Claessen, D., 2019. “Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria.” Adv. Microb. Physiol. 74, 97–141.

Valentini, M., Filloux, A., 2016. “Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria.” J. Biol. Chem. 291, 12547–55.

Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., Filloux, A., 2016. “The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility.” PLoS Genet. 12, e1006354.

van Delden, C., Comte, R., Bally, A.M., 2001. “Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*.” J. Bacteriol. 183, 5376–84.

van Rossum, T., Muras, A., Baur, M.J.J., Creutzburg, S.C.A., van der Oost, J., Kengen, S.W.M., 2017. “A growth- and bioluminescence-based bioreporter for the in vivo detection of novel biocatalysts.” Microb. Biotechnol. 10, 625–641.

Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., D’Ari, R., 2005. “Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*.” Mol. Microbiol. 56, 958–970.

Visca, P., Imperi, F., 2018. “An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur.” Future Microbiol. 13, 853–856.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., Lamont, I.L., 2002. “Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: Lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*.” Mol. Microbiol.

Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. “Peptidoglycan structure and architecture.” FEMS Microbiol. Rev. 32, 149–167.

Vorregaard, M., 2008. Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms. Technical University of Denmark.

Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S., Matsushashi, M., 1987. “Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*.” J. Bacteriol. 169, 4935–4940.

Wachi, M., Matsushashi, M., 1989. “Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells.” J. Bacteriol. 171, 3123–3127.

Wagner, P.L., Waldor, M.K., 2002. “Bacteriophage control of bacterial virulence.” Infect. Immun.

Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H., 2003. “Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment.” J. Bacteriol. 185, 2080–95.

Wang, C., Chen, W., Xia, A., Zhang, R., Huang, Y., Yang, S., Ni, L., Jin, F., 2019. “Carbon starvation induces the expression of PprB-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*.” Appl. Environ. Microbiol. AEM.01705-19.

Wang, D., Seeve, C., Pierson, L.S., Pierson, E.A., Pierson, E.A., 2013. “Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.” BMC Genomics 14, 618.

Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D.J., Ma, L.Z., 2015. “The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas*

- aeruginosa*.” Environ. Microbiol. Rep. 7, 330–340.
- Wang, Y., Ha, U., Zeng, L., Jin, S., 2003.** “Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*.” Antimicrob. Agents Chemother. 47, 95–101.
- Webb, J.S., Lau, M., Kjelleberg, S., 2004.** “Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.” J. Bacteriol. 186, 8066–8073.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2003.** “Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development.” J. Bacteriol. 185, 4585–4592.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J.W., Prüß, B.M., Babitzke, P., Romeo, T., 2001.** “Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*.” Mol. Microbiol. 40, 245–256.
- Wei, Q., Le Minh, P.N., Dötsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., Schulz, S., Plaisance, S., Charlier, D., Hassett, D., Häussler, S., Cornelis, P., 2012.** “Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen.” Nucleic Acids Res. 40, 4320–4333.
- Wei, Q., Ma, L.Z., 2013.** “Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.” Int. J. Mol. Sci. 14, 20983–1005.
- Wessel, A.K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E.M., Whiteley, M., 2013.** “Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation.” J. Bacteriol. 195, 213–219.
- West, S.E., Sample, A.K., Runyen-Janecky, L.J., 1994.** “The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family.” J. Bacteriol. 176, 7532–42.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001.** “Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.” Nature 413, 860–864.
- Wick, M.J., Frank, D.W., Storey, D.G., Iglewski, B.H., 1990.** “Structure, Function, and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A.” Annu. Rev. Microbiol. 44, 335–363.
- Williams, H.D., Behrends, V., Bundy, J.G., Ryall, B., Zlosnik, J.E.A., 2010.** “Hypertonic Saline Therapy in Cystic Fibrosis: Do Population Shifts Caused by the Osmotic Sensitivity of Infecting Bacteria Explain the Effectiveness of this Treatment?” Front. Microbiol. 1, 120.
- Wilson, M.E., Haswell, E.S., 2012.** “A role for mechanosensitive channels in chloroplast and bacterial fission.” Plant Signal. Behav. 7, 157.
- Wilson, M.E., Jensen, G.S., Haswell, E.S., 2011.** “Two mechanosensitive channel homologs influence division ring placement in *Arabidopsis* chloroplasts.” Plant Cell 23, 2939–49.
- Wilson, M.E., Maksaev, G., Haswell, E.S., 2013.** “MscS-like mechanosensitive channels in plants and microbes.” Biochemistry 52, 5708–5722.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., Lewenza, S., 2016.** “Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.” Antimicrob. Agents Chemother. 60, 544.
- Winnie, G.B., Cowan, R.G., 1991.** “Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlations between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function.” Pediatr. Pulmonol. 10, 92–100.
- Withers, T.R., Yin, Y., Yu, H.D., 2014.** “Identification of Novel Genes Associated with Alginate Production in *Pseudomonas aeruginosa* Using Mini-*himar1* Mariner Transposon-mediated Mutagenesis.” J. Vis. Exp.

- Wood, J.M., 2015. "Bacterial responses to osmotic challenges." *J. Gen. Physiol.* 145, 381–8.
- Wood, L.F., Ohman, D.E., 2012. "Identification of genes in the σ^{22} regulon of *Pseudomonas aeruginosa* required for cell envelope homeostasis in either the planktonic or the sessile mode of growth." *MBio* 3.
- Wood, L.F., Ohman, D.E., 2009. "Use of cell wall stress to characterize σ^{22} (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol. Microbiol.* 72, 183–201.
- Woodruff, W.A., Hancock, R.E., 1989. "*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein." *J. Bacteriol.* 171, 3304–9.
- Wozniak, D.J., Ohman, D.E., 1994. "Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*." *J. Bacteriol.* 176, 6007–14.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M.R., 2003. "Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7907–12.
- Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., Jacobs, M.A., Nishimura, M.I., Hancock, R.E.W., Turner, J.R., Alverdy, J.C., 2005. "Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*." *Science* 309, 774–7.
- Wu, W., Jin, S., 2005. "PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage." *J. Bacteriol.* 187, 6058–68.
- X**u, X., Yu, H., Zhang, D., Xiong, J., Qiu, J., Xin, R., He, X., Sheng, H., Cai, W., Jiang, L., Zhang, K., Hu, X., 2016. "Role of ppGpp in *Pseudomonas aeruginosa* acute pulmonary infection and virulence regulation." *Microbiol. Res.* 192, 84–95.
- Y**oon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., Rowe, J.J., Iglewski, B.H., McDermott, T.R., Mason, R.P., Wozniak, D.J., Hancock, R.E.W., Parsek, M.R., Noah, T.L., Boucher, R.C., Hassett, D.J., 2002. "*Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis." *Dev. Cell* 3, 593–603.
- Yura, T., Nagai, H., Mori, H., 1993. "Regulation of the Heat-Shock Response in Bacteria." *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 321–350.
- Z**aborskyte, G., Andersen, J.B., Kragh, K.N., Ciofu, O., 2017. "Real-Time Monitoring of *nfxB* Mutant Occurrence and Dynamics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Exposed to Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin." *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.
- Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Mulet, X., Blázquez, J., Oliver, A., 2014. "The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation." *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5084–95.
- Zeng, L., Skinner, S.O., Zong, C., Sippy, J., Feiss, M., Golding, I., 2010. "Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection." *Cell* 141, 682–91.
- Zhang, L., Gallo, R.L., 2016. "Antimicrobial peptides." *Curr. Biol.* 26, R14–R19.
- Zhao, K., Tseng, B.S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M.L., Harrison, J.J., Luijten, E., Parsek, M.R., Wong, G.C.L., 2013. "Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Nature* 497, 388–391.

- Zhu, K., Rock, C.O., 2008.** “RhIA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*.” *J. Bacteriol.* 190, 3147–3154.
- Zhu, M., Zhao, J., Kang, H., Kong, W., Liang, H., Wu, M., Liang, H., 2016.** “Modulation of Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the PA4857 Gene Product.” *Front. Microbiol.* 7, 7.

Annexes

I. **Annexe 1. The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*.**

J'ai contribué à cet article par la relecture du manuscrit.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*

Maud Flécharde¹, Rachel Duchesne¹, Ali Tahriroui¹, Emeline Bouffartigues¹, Ségolène Depayras¹, Julie Hardouin², Coralie Lagy¹, Olivier Maillot¹, Damien Tortuel¹, Cecil Onyedikachi Azuama¹, Thomas Clamens¹, Cécile Duclairoir-Poc¹, Manuella Catel-Ferreira¹, Gwendoline Gicquel¹, Marc G. J. Feuilleley¹, Olivier Lesouhaitier¹, Hermann J. Heipieper³, Marie-Christine Groleau⁴, Éric Déziel⁴, Pierre Cornelis¹ & Sylvie Chevalier¹

In *Pseudomonas aeruginosa*, SigX is an extra-cytoplasmic function σ factor that belongs to the cell wall stress response network. In previous studies, we made the puzzling observation that *sigX* mutant growth was severely affected in rich lysogeny broth (LB) but not in minimal medium. Here, through comparative transcriptomic and proteomic analysis, we show that the absence of SigX results in dysregulation of genes, whose products are mainly involved in transport, carbon and energy metabolisms. Production of most of these genes is controlled by carbon catabolite repression (CCR), a key regulatory system that ensures preferential carbon source uptake and utilization, substrate prioritization and metabolism. The strong CCR response elicited in LB was lowered in a *sigX* mutant, suggesting altered nutrient uptake. Since the absence of SigX affects membrane composition and fluidity, we suspected membrane changes to cause such phenotype. The detergent polysorbate 80 (PS80) can moderately destabilize the envelope resulting in non-specific increased nutrient intake. Remarkably, growth, membrane fluidity and expression of dysregulated genes in the *sigX* mutant strain were restored in LB supplemented with PS80. Altogether, these data suggest that SigX is indirectly involved in CCR regulation, possibly *via* its effects on membrane integrity and fluidity.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen causing infections in immune-compromised persons and the main etiological agent of chronic infections strongly compromising the health of cystic fibrosis individuals¹. The 6.3 mb genome of *P. aeruginosa* PAO1 encoding 5,570 predicted open reading frames (ORFs), contains a strikingly high proportion of two-component regulatory systems (2.1%) and transcriptional regulators (7.2%)². These regulators have been hypothesized to provide the regulatory framework for the remarkable environmental adaptability of *P. aeruginosa*. Together with two-component (TCS) and quorum sensing (QS) systems, alternative sigma factors are among the most important regulators of *Pseudomonas*. Sigma factors are multi-domain subunits of bacterial RNA polymerase (RNAP) that play critical roles in transcription initiation, including the recognition and opening of promoters as well as the initial steps in RNA synthesis. While the primary sigma factor σ^{70} ensures the bulk of transcription during growth, a major strategy used by bacteria to differentially regulate gene expression consists in modifying the RNAP promoter specificity by means of alternative sigma factors. Among these factors, extra-cytoplasmic function sigma factors (ECF σ) constitute the most abundant group identified based on their homology with the primary sigma factor σ^{70} ³. Upon environmental stresses or specific inducing factors,

¹Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Micro-environnement, LMSM EA 4312, Evreux, France. ²Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, PBS, UMR, 6270 CNRS, Mont-Saint-Aignan, France. ³Department of Environmental Biotechnology, UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany. ⁴INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada. Maud Flécharde and Rachel Duchesne contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. (email: sylvie.chevalier@univ-rouen.fr)

signalling networks result in the release of the sigma factors, which then recruit the RNAP catalytic core and trigger gene expression of dedicated target regulons reprogramming, and triggering adaptive responses for the survival of the cell. *P. aeruginosa* PAO1 has 19 ECF σ factors⁴, including SigX that was recently described as a new cell wall stress response ECF σ ^{5,6}. SigX is a master regulator of bacterial adaptation that impacts more than 250 genes, including genes involved in adaptation/protection, heat shock response, chemotaxis, motility/attachment, virulence and virulence-associated genes linked to the protein secretion/export apparatus or secreted factors^{7–10}. Importantly, SigX is involved in modulation of fatty acid (FA) and phospholipid metabolisms in *P. aeruginosa* PA14^{9–11}, and overexpression of SigX results in “swollen” cells that contain higher amounts of shorter chain FA with more fluid membrane¹¹. Interestingly, SigX shares 49% similarity with SigW, a membrane-fluidity homeostasis regulator of the Gram-positive *Bacillus subtilis* induced by factors that affect cell wall biosynthesis¹².

In previous studies, we made the puzzling observation that the growth of *P. aeruginosa sigX* mutant was severely affected in lysogeny broth (LB), but not in M9-glucose minimal medium (M9G)^{8,13}. Whereas M9G contains glucose as sole carbon source, the rich undefined LB medium is a complex mixture of substances, among which the most abundant carbon sources are small peptides and amino acids brought by tryptic digest of casein and yeast extract, as well as dicarboxylic acids such as succinate¹⁴. Since SigX is involved in membrane homeostasis by regulating its fluidity, possibly impacting nutrients uptake, we raised the hypothesis that growth alterations of the *sigX* mutant observed in LB could be linked to changes in some important metabolic pathways due to membrane alterations.

Results and Discussion

The absence of SigX results in large shifts in genes expression and proteins synthesis. Transcriptomic and proteomic analyses based on comparison between *P. aeruginosa* H103 and PAOSX (*sigX* mutant) grown in LB were performed. Global transcriptome analysis revealed a total of 758 expressed genes ($p < 0.05$ by Empirical Bayes statistical test) that differed by more than 2-fold (Supplementary Table S1), indicating that the deletion of *sigX* exerts a large and global impact on gene expression during growth in LB. Of these genes, 338 were down-regulated in the mutant while 420 were up-regulated, corresponding to nearly 14% of the total PAO1 genome. Sixteen genes that were differentially expressed between the WT H103 and PAOSX were further selected for validation using qRT-PCR, showing good correlation with microarrays data with a squared Pearson's correlation coefficient of 0.83 (Supplementary Fig. S1). These results are in line with the previous study made on PAOSX grown in M9G⁸, and others that were conducted with a PA14 *sigX* mutant and overproducing strains⁹. Indeed, the transcriptome data in this study (PAO1 *sigX* mutant grown in LB medium containing 171 mM NaCl) overlapped with 26.4% and 15.7% of the genes identified in PA14 *sigX* mutant and SigX overexpressing strain grown in LB containing 8 mM NaCl, respectively⁹ (Supplementary Figure S2A). The transcriptomic data set of the *sigX* mutant grown in M9G⁸ overlapped with 17.7% of the genes identified in this study. A total of 15 common genes were identified in all four transcriptomes (Supplementary Figure S2A). The results of this transcriptional analysis contrast with the fact that most ECF σ exhibit a relatively small regulon¹⁰, with the exception of AlgU in *P. aeruginosa*, the homolog of *E. coli* RpoE¹⁵. It is worth to mention that, in addition to SigX, AlgU is also an ECF σ that is involved in the envelope (periplasmic) stress response in *P. aeruginosa*^{4,10}. However, a large proportion of the differences observed in gene expression may probably be due to indirect effects caused by the absence of *sigX*, as suggested by the large number of genes up-regulated in PAOSX mutant.

The global proteome analysis led to identify 1055 \pm 49 and 1075 \pm 23 proteins in case of H103 and PAOSX, respectively, corresponding to about 19% of *P. aeruginosa* total proteome, out of which 92 proteins were displaying a significant change in abundance between the two strains (Supplementary Table S2). About 2/3 of these proteins, *i.e.* 54 out of 92 proteins, are encoded by genes that were also differentially expressed in transcriptomic data, and depicted as a VENN diagram (Supplementary Figure S2B). Such discrepancy between protein and transcript abundances can be at least partly explained by the techniques used, since membrane proteins in particular, are quite difficult to extract. However, based on a hyper-geometrical testing, the overlap between the proteomic and transcriptomic data was shown to be significant (p -value = 7.5×10^{-23}). Furthermore, we analyzed the overlap of our proteome data with the proteome of PA14 SigX overexpressing strain¹¹. Only 8 proteins were present in the two proteomes (Supplementary Figure S2C), a result that can be at least partly explained by the different approaches used (2-DE or LTQ-orbitrap), the growth medium (LB containing 171 or 85 mM NaCl) or the *P. aeruginosa* strain (PAO1 or PA14).

Based on a PseudoCAP analysis¹⁶, the most striking result is the dysregulated expression of numerous proteins and genes involved in several functional classes related to transport and metabolism (energy, carbon compound, amino acids, intermediary, FA and phospholipids (Fig. 1), suggesting global and drastic changes in the physiology and nutritional metabolism of the *sigX* mutant. Since these alterations in gene and protein expression could at least partly explain the growth defects of PAOSX in LB, we focused subsequent analysis on selected genes from these major categories (Supplementary Table S3, Fig. 1).

Transporters of small molecules and membrane proteins. The expression of 52 membrane transporters or transport-associated proteins was affected in the *sigX* mutant compared to H103 (Supplementary Table S3). For example, the expression of genes encoding the specific porins OprB, OprE, OprH, OpdC¹⁷, as well as the copper import TonB-dependent transporter OprC¹⁸, was reduced by 2 to 7.7-fold (Supplementary Table S3). Similar data were previously reported when PAOSX was grown in M9G^{8,13}. Conversely, genes encoding OpdQ (a putative nitrate transporter¹⁹) and OpdP (also called OpdD, a glycine-glutamate dipeptide transporter) were increased by 14.8 and 3.2-fold, respectively in the *sigX* mutant strain compared to H103 WT. Expression of many carboxylic acids, carbohydrates and amino acids inner membrane (IM) transporters was also dysregulated. For example, the genes encoding the malonate transporter MadL/MadM and the dicarboxylic acid transporter PcaT were strongly up-regulated in the *sigX* mutant. This was noticeably also the case of genes, whose

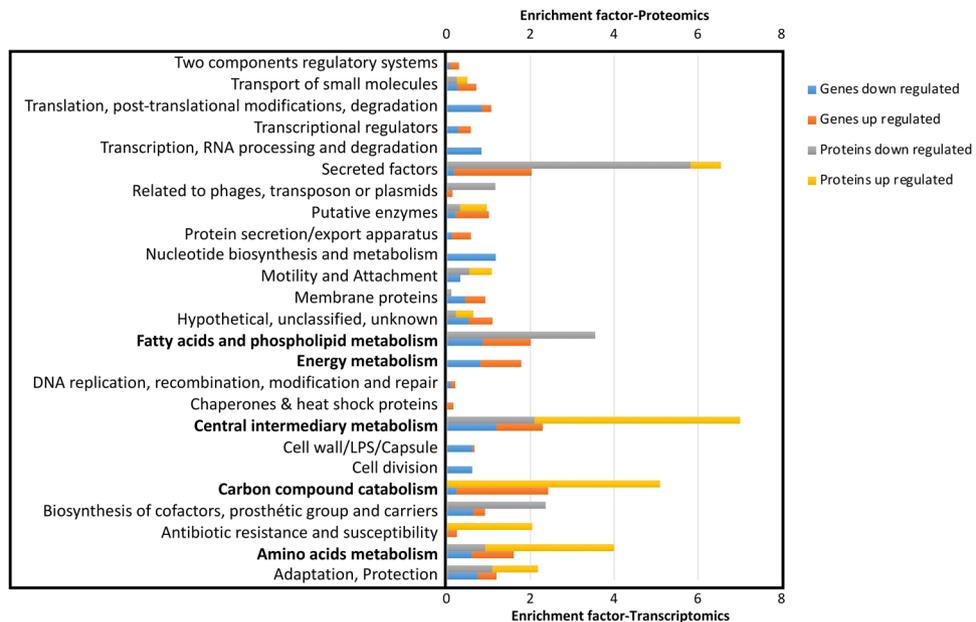


Figure 1. Functional classification of genes and proteins that are over- and under-represented in *P. aeruginosa* PAOSX compared to H103. The PseudoCAP annotation (www.pseudomonas.com)¹⁶ was used to categorize the members of the significantly differentially abundant genes or proteins, and enrichment of specific classes of genes or proteins relative to their distribution in PAO1 is displayed as the enrichment factor. The functional classes that will be discussed are indicated in bold.

products are involved in the metabolization of these substrates (PA0208-PA0214 and PA0226-PA0235, respectively) (Supplementary Table S3, see section carbon metabolism). By contrast, PA1183 and PA4616 encoding the major DctA C₄-dicarboxylate transporter and a putative C₄-dicarboxylate binding protein of the DctP family, respectively, were down regulated in the *sigX* mutant (Supplementary Table S3). Similarly, the expression of all the genes in the *gltBFGK-oprB* operon, which are involved in glucose uptake¹⁷, is decreased in PAOSX, suggesting a reduced glucose supply in PAOSX. The operons PA1946-PA1948 (*rbsBAC*) and PA2338-PA2341 (*mltEFGK*), encoding components of a ribose transporter and mannose/mannitol transporters, respectively, were up-regulated in PAOSX. The *putA* and *putP* genes involved in the utilization of proline are also down-regulated in the PAOSX strain. The expression of several genes coding for components of ABC transporters, many of them are selective for amino acids, was increased in the *sigX* mutant, including *agtAB*, *aatPJ*, *braCG* (for branched-chain amino acids uptake), PA5094-PA5099 (for histidine uptake), and *opuC* coding for a glycine betaine transporter involved in osmoprotection (Supplementary Table S3). Taken together, expression of many genes coding for OM porins as well as IM transporters was dysregulated in the *sigX* mutant strain, suggesting that PAOSX could be affected in nutrients import in LB.

Fatty acid and phospholipid metabolisms. Several genes involved in FA biosynthesis showed a markedly decreased expression in the *sigX* mutant (Supplementary Table S3; Supplementary Figure S3). Several steps of the initiation and elongation of FA biosynthesis are impacted since the expression of *fabD*, *fabY*, *fabB*, *fabA* and *fabZ* genes was clearly reduced in the *sigX* mutant. These data are in line with previous studies performed on a PA14 *sigX* mutant^{9,10} or a SigX overproducing strain¹¹, where ChIP-sequencing assays^{9,10} or proteomic data¹¹, respectively, led to the conclusion that at least some of these genes could be direct targets of SigX. Proteome analysis further indicated that the expression of FabG, FabD and FabY was also decreased at protein level (Supplementary Table S3). In addition, the expression of *AccA*, that catalyzes, together with *AccD*, the first step in FA biosynthesis, is also affected (Supplementary Table S3). The reaction catalyzed by *AccAD* requires the presence of biotin carboxyl carrier protein that is produced by the carboxylation of the product of *accB* (PA4847) by a biotin carboxylase encoded by *accC* (PA4848). Another putative biotin carboxylase homolog sharing 55% identity with *AccC* is encoded by PA0494, a gene lying in the PA0493-PA0496 operon, whose transcript level is also strongly decreased (>6×) in PAOSX (Supplementary Table S3). Moreover, the product of PA0493 shares 40% identity with *AccB*. Although the precise function of the proteins encoded by PA0493 and PA0494 is unknown, these data further suggest that the first step in FA biosynthesis is somehow affected by the *sigX* mutation.

Carbon metabolism. One of the most striking data of our global studies is the strong up-regulation of the *ant*, *cat*, *pca* and *xyl* operons that are involved in carbon metabolic pathways (Supplementary Table S3, Fig. 2A). In *Pseudomonas* spp. the degradation of the aromatic amino acid anthranilate is achieved by the anthranilate dioxygenase complex (*antABC* operon), which is involved in the conversion of anthranilate to catechol (Fig. 2B)²⁰. Catechol is further metabolized by the *cat* and *pca* gene products to generate intermediates of the tricarboxylic acid cycle (TCA) including acetyl-CoA²¹. Catechol is also a product of the benzoate degradation pathway (*xyl*

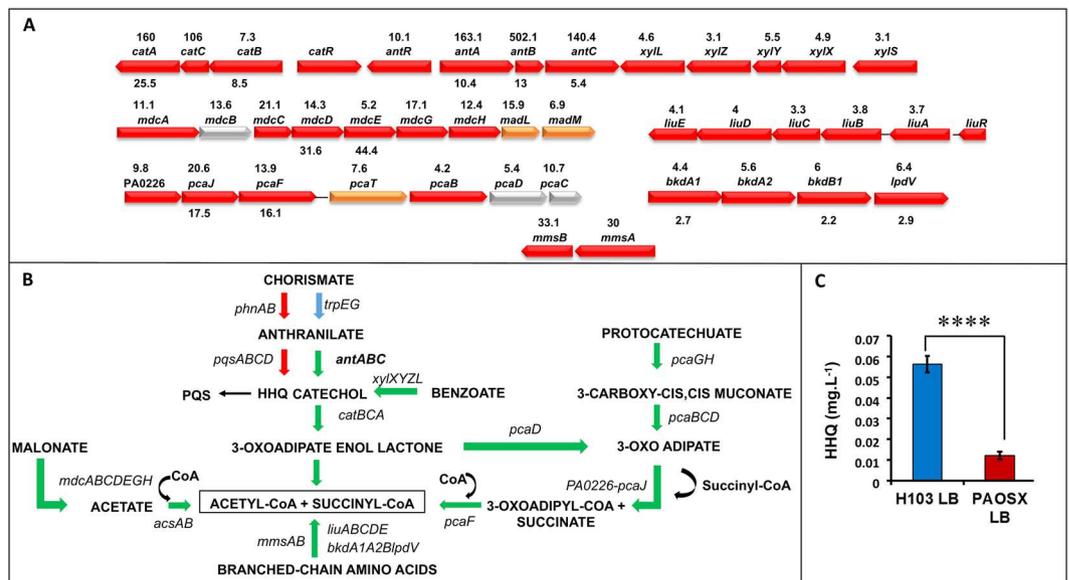


Figure 2. The carbon and anthranilate metabolic pathways are affected by the *sigX* deletion. Major carbon catabolic pathways leading to acetyl-CoA production are depicted. (A) Operons that are dysregulated in the *sigX* mutant strain are depicted as indicated on pseudomonas.com¹⁶. The fold change between PAOSX and H103 gene and protein expression is indicated above and below the genes, respectively. Colours correspond to protein localization: red: cytoplasmic; orange: cytoplasmic membrane; yellow: periplasmic; grey: unknown). (B) Major metabolic pathways that are dysregulated in PAOSX compared to H103. Arrows in green: up-regulated pathways; in red, down-regulated pathways, in blue: unaffected pathways. (C) HHQ production quantification (mg.L⁻¹) by LC/MS in PAOSX and H103. Statistics were achieved by unpaired t-test: *****p* < 0.0001.

operon). The *antABC* genes are positively regulated by the LysR-type regulator AntrR²⁰, whose gene expression is also 10-fold up-regulated in the *sigX* mutant. In parallel, the expression of the *pqs* operon (for *Pseudomonas* quinolone signal), that is involved in a quorum-sensing system allowing cell-to-cell communication, was reduced at both mRNA and protein levels. Taken together, these results suggest that anthranilate is preferably channelled to feed the TCA cycle rather than being used for biosynthesis of HHQ (2-heptyl-4-hydroxyquinoline), the precursor of the quorum sensing PQS pathway²², or tryptophan. This was further confirmed by HHQ quantification using LC-MS/MS, since this compound was about 5-fold lower accumulated in PAOSX compared to the WT strain (Fig. 2C). It is noteworthy here, that while PQS levels were still very low (near limit of detection) at this early time point, the mutant was also producing less than the WT strain. In addition to the redirection of anthranilate metabolism, other genes involved in metabolic pathways leading to the production of acetyl-CoA were strongly up-regulated in the *sigX* mutant. This was the case for the *mdcABCDEFGH* and *acsAB* operons, whose products catalyse the conversion of malonate or acetate, respectively into acetyl-CoA (Fig. 2B).

Amino acid metabolism. Most genes belonging to the amino acids metabolism functional class are up-regulated in the *sigX* mutant, suggesting an indirect effect of *sigX* deletion on the expression of these genes (Supplementary Table S3). Strikingly, many operons encoding enzymes belonging to the degradation pathway of the branched-chain amino acids leucine, valine and isoleucine were strongly up-regulated. This is particularly exemplified in the case of L-leucine conversion to acetyl-CoA (Supplementary Table S3, Fig. 2A,B)²³. The Ldh leucine dehydrogenase converts leucine in 4-methyl-2-oxo-pentanoate, which is further converted to isovaleryl-CoA by the combined action of BkdA1 and BkdA2, BkdB, and LpdV. The different Liu proteins are involved in the further catabolism of isovaleryl-CoA leading to the final products acetate and acetyl-CoA²³. Noticeably, some of the corresponding proteins were also more abundant in the *sigX* mutant (Supplementary Table S3). Furthermore, the *hutUH* and *hutIG* operons, which encode enzymes involved in the degradation of histidine into glutamate²⁴ showed an increased expression in the *sigX* mutant (Supplementary Table S3). The most up-regulated gene is *hutH* (more than 30-fold) that codes for the histidine ammonia lyase, which performs the first step of histidine catabolism, generating urocanate and ammonium²⁴. The genes PA5095-5096-*hutT* and PA5099 coding for associated transporters are likewise up-regulated in PAOSX. This global metabolic reorientation leading to the induction of the TCA cycle may be a compensatory mechanism triggered by PAOSX to cope with energy depletion.

Energy generation. Figure 3A presents the different respiratory electron transport chains of *P. aeruginosa*²⁵ and the changes observed in PAOSX when grown in LB. The *aa3* genes encoding the low O₂ affinity cytochrome oxidase were up-regulated in PAOSX while one set of the *cbh3* genes coding for an oxidase with high-affinity for O₂ were down-regulated (Fig. 3A). Interestingly, the *aa3*-type cytochrome c oxidase was shown to be induced in response to carbon starvation²⁵ and facilitates survival in nutrient starvation conditions²⁶, suggesting that PAOSX may encounter a nutrient stress. In addition, the expression of the gene encoding the aerotaxis sensor

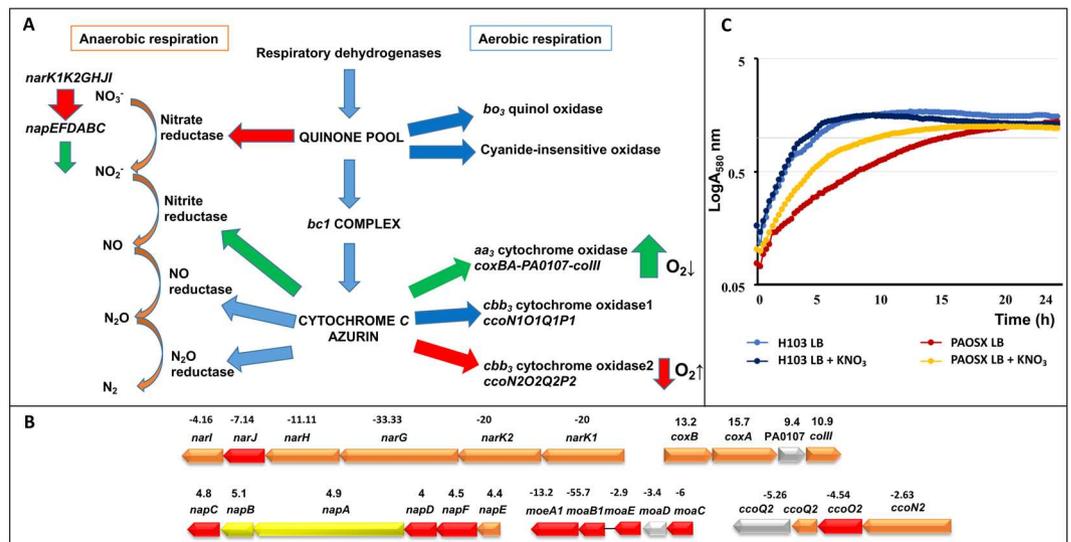


Figure 3. The respiratory network is affected in the *sigX* mutant. **(A)** Major aerobic and anaerobic pathways. Arrows in green: up-regulated pathways in PAOSX; in red, down-regulated pathways, in blue: unaffected pathways. **(B)** Operons that are dysregulated in the *sigX* mutant strain (fold change is indicated above the genes) are depicted as indicated on pseudomonas.com¹⁶. Colours correspond to protein localization: red: cytoplasmic; orange: cytoplasmic membrane; Yellow: periplasmic; grey: unknown). **(C)** Growth of H103 and PAOSX in LB or LB supplemented with KNO_3 .

Aer that is positively regulated by the anaerobic transcriptional regulator Anr, was lowered in the *sigX* mutant. The genome of *P. aeruginosa* contains two *cbb3* oxidase operons, *ccoN1O1Q1P1* and *ccoN2O2Q2P2*. While the first one is always expressed, the *ccoN2O2Q2* operon whose expression is reduced in PAOSX, is induced by stress, nutrient limitation and low oxygen conditions²⁵ (Supplementary Table S3, Fig. 3B). Furthermore, the *nar* genes, encoding the membrane respiratory nitrate reductase that generates a H^+ gradient, are strongly down-regulated in PAOSX, while the *nap* genes, which code for the periplasmic nitrate reductase that does not contribute to the building of a proton motive force, are up-regulated in the *sigX* mutant. Consistently, the genes encoding the NarXL TCS were down-regulated in PAOSX. Indeed, under anaerobic growth conditions, NarL was shown to directly repress expression of the periplasmic nitrate reductase while inducing maximal expression of the membrane nitrate reductase²⁷. Under static conditions, the growth defect of PAOSX in LB was partially restored by supplementation with KNO_3 (Fig. 3C). It is known that nitrate induces the *nar* operon under anaerobic conditions via the Anr and Dnr regulators and the NarXL TCS²⁸. This suggests that the addition of nitrate under our low aeration condition may stimulate the growth of the *sigX* mutant by increasing the transcription of the *narK1K2GHJI* operon. Furthermore, we observed that the transcript level of the PA3914-PA3918 operon (*moaA1-moaB1-moaE-moaC-moaD*) was strongly down-regulated in the PAOSX mutant. This gene cluster is involved in the biosynthesis of the molybdenum cofactor, which is needed for the activity of all nitrate reductases²⁹. This decreased expression was also linked to a lower expression of the *modA* gene involved in molybdenum acquisition³⁰. These alterations suggest that decreased Nar-dependent generation of ATP might contribute to the mutant growth defect at least in anaerobic but probably not in aerobic conditions, in which the transcriptomic and proteomic analysis were carried out. In the latter condition, the dysregulation of the O_2 -dependent oxidases may suggest that O_2 perception or diffusion may be different between the two strains.

The absence of SigX results in alterations in the Crc, Hfq and CbrAB regulatory networks. In numerous bacterial species, the uptake and utilization of carbon compounds is controlled in a hierarchical manner by carbon catabolite repression (CCR). Broadly, CCR prevents the utilization of less-preferred carbon sources for as long as the preferred one is not fully consumed. In Pseudomonads the presence of organic acids such as succinate triggers CCR response, which leads to repression of catabolic genes required for the consumption of other carbon sources. CCR is thought to be elicited mainly through a regulatory system based on Crc and Hfq together with CrcZ, a small RNA that belongs to the regulon of the CbrAB TCS and which is reported to antagonize the effects of both regulatory proteins^{31–33}. When CCR is not needed, CrcZ forms a complex with Hfq and possibly also with Crc, which renders these proteins unavailable to repress translation initiation of their targets^{31,33,34}. The strong repression exerted by the Crc/Hfq system during exponential growth in LB ceases when the cells reach the stationary phase. Since LB elicits a strong CCR response³¹, the involvement of these regulatory networks in the *sigX* mutant strain was therefore further investigated.

Reduced expression and activity of the carbon catabolic regulator Crc in the *sigX* mutant strain. In *P. aeruginosa*, CCR is at least partly regulated by the Crc regulator^{32,35,36}. Transcriptomic analysis performed during growth in LB revealed that *crc* (PA5332) was lower expressed in PAOSX compared to H103 (PAOSX/H103 = 0.31 ± 0.06), a result that was confirmed by qRT-PCR (Supplementary Table S3). Interestingly, the gene expression profile of PAOSX exhibits several similarities with that of a *crc* mutant of *P.*

aeruginosa during growth in LB³⁶. Inactivation of *crc* modifies the expression of at least 57 genes in *P. aeruginosa* among which many are involved in the transport and assimilation of amino acids and sugars, or in energy metabolism³⁶. Under our conditions, 48 of these Crc-regulated genes were significantly affected in the *sigX* mutant strain. Most of these genes encode proteins involved in the transport of glutamate or derivatives (porins OpdP, OpdQ) and aspartate (*aat* genes), branched-chain (*braC*) and aromatic (*aroP2*) amino acids, and organic acids (OpdH porin) (Supplementary Table S3). The stronger expression of these genes encoding components of transport systems is paralleled by that of genes involved in the assimilation of the amino acids valine, leucine and isoleucine (*bkdA1A2B*, *lpdV*, *liuABCD*), or phenylalanine and tyrosine (*phhAB* and *hpd*). Furthermore, Crc was previously shown to stimulate the expression of the low affinity C₄-dicarboxylate transporter (DctA) that is involved in the uptake of succinate and fumarate, two of the preferential carbon sources used by *P. aeruginosa*³⁷. Interestingly, *dctA* (PA1183) was strongly down-regulated in PAOSX, in agreement with the lower expression of *crc*. Finally, Crc mediates catabolite repression of *amiE*, which encodes a short-chain aliphatic amidase and can be used as a reporter gene for CCR³⁷. Taken together, and since *amiE* expression was strongly increased at both the mRNA and protein levels in PAOSX (Supplementary Table S3), our data support that Crc-based regulation is strongly reduced in the *sigX* mutant compared to H103 when grown in LB. Crc regulates gene expression post-transcriptionally^{32,35,36}. However, much of what is known about CCR comes from work on mutants lacking the Crc protein in *P. aeruginosa*^{32,36}. Due to the techniques used herein (microarrays and proteomics), some Crc targets, the expression of which was disturbed, were not identified at the protein level to observe post-transcriptional regulation. However, initially deemed to act as a translational regulator, Crc is devoid of any RNA binding activity in the absence of the regulator Hfq³⁸, indicating that Crc and Hfq cooperate in catabolite repression. Very recently, Crc was shown to enhance the stability of Hfq/Crc/RNA complexes, which can explain its facilitating role in Hfq-mediated translational repression, and to prioritize the function of Hfq toward utilization of favored carbon sources³⁹. Thus, in lowering the transcripts of *crc* in PAOSX, and possibly also Crc abundance (even if not shown in the proteomic data), it is possible that Hfq may not be directed on these targets mRNA, leading to alleviate its repression on its CCR targets in the *sigX* mutant.

Hfq repressor activity is lowered in the *sigX* mutant strain. In *P. aeruginosa* PAO1, the RNA chaperone Hfq was identified as the main post-transcriptional regulator of CCR³¹. A transcriptomic analysis of a *hfq* mutant strain revealed that 15% of the genes were differentially regulated⁴⁰. Many of them encode proteins involved in carbon compound catabolism and were up-regulated in the absence of Hfq⁴⁰. In a very recent study, Kambara *et al.* found that (i) Hfq associates with hundreds of nascent transcripts in *P. aeruginosa*, (ii) Hfq and Crc frequently act together co-transcriptionally and (iii) association of Crc with nascent transcripts is Hfq-dependent⁴¹. Interestingly, 102 genes whose expression was dysregulated in a *hfq* mutant^{31,40}, were similarly affected in PAOSX, at the transcript level, and for 22 of them, at the protein level (Supplementary Table S3, Hfq⁽¹⁾ and Hfq⁽²⁾). Among them, the Crc/Hfq regulated genes, which are mostly involved in amino acids metabolism, showed an increased expression in the *sigX* mutant. Fifty-three genes involved in carbon metabolism that were over-expressed in the *hfq* mutants^{31,40} were also strongly up-regulated in PAOSX (Supplementary Table S3). This was particularly significant in the case of the *ant*, *cat*, and *xyl* operons, and of *amiE*. Five additional Hfq targets (*opdO*, *mdcD*, *mdcE*, *pagL*, *pycB*), previously identified by CHIP-seq⁴¹, were showing altered mRNA and/or protein abundances in PAOSX (Supplementary Table S3, Hfq⁽³⁾). As the transcript level of *hfq* was not modified in the mutant (PAOSX/H103 = 0.93 ± 0.03), and as the proteomic data did not allow to conclude about Hfq protein amount (not detected in all replicates), our results suggest that Hfq protein amount or activity itself might be reduced. Since reduced activities of both Crc and Hfq might occur in PAOSX, this prompted us to investigate the activity of the CrcZ sncRNA, whose transcription is augmented when CCR is alleviated³¹. Interestingly, the level of CrcZ was significantly increased in PAOSX compared to the wild type (PAOSX/H103 = 2.39 ± 0.78), suggesting reduced levels of free Hfq and Crc in the cytosol due to their sequestration by this sncRNA⁴².

The CbrAB regulatory system is over-activated in the *sigX* mutant. A large number of genes transcriptionally down-regulated in a *cbrB* mutant of *P. aeruginosa* grown in LB broth³⁶ were globally up-regulated in the *sigX* mutant strain (Supplementary Table S3, CbrAB), suggesting that the CbrAB pathway is over-activated in PAOSX. Apart from the *crcZ* promoter, known direct CbrB targets include the *lipA* and *hutU* promoters^{43,44}. Accordingly, their transcripts abundance was increased in PAOSX. Furthermore, the *pha* genes, whose products allow bacteria to store excess carbon into the carbon-storage polyhydroxyalkanoates (PHA)-granules⁴⁵, are up-regulated in the *sigX* mutant (Supplementary Table S3). PHA are produced by various bacterial species as intracellular carbon and energy storage materials under nutrient-limited conditions in the presence of excess carbon sources, and their synthesis is inhibited by the Crc/Hfq system during exponential growth⁴⁶.

Taken together, our data suggest that strongly altered regulations of metabolic pathways lead to a reduced CCR in the *sigX* mutant compared to H103 WT strain. More precisely, the CbrA/B system was found to be over-activated in PAOSX, leading to a higher production of CrcZ which in turn would sequester the translational regulators Hfq and Crc during growth in LB. In addition, transcription of *crc* was found to be down-regulated in PAOSX, further stimulating the expression of the Crc regulon. During growth in M9G, CCR is strongly reduced since glucose is the sole carbon source available: this could explain why PAOSX exhibits no growth defect under these conditions^{8,13}.

The growth and metabolic networks dysregulation of the *sigX* mutant are restored by polysorbate 80 supplementation. As indicated above, the *sigX* mutant strain was strongly affected in the expression of nutrient transporters and in major metabolic regulatory pathways including CCR, suggesting that nutrient uptake would be disturbed. It is well known that detergents, at low concentration, can moderately destabilize the bacterial envelope resulting in a non-specific increased nutrient intake. Polysorbate 80 (PS80) can thus

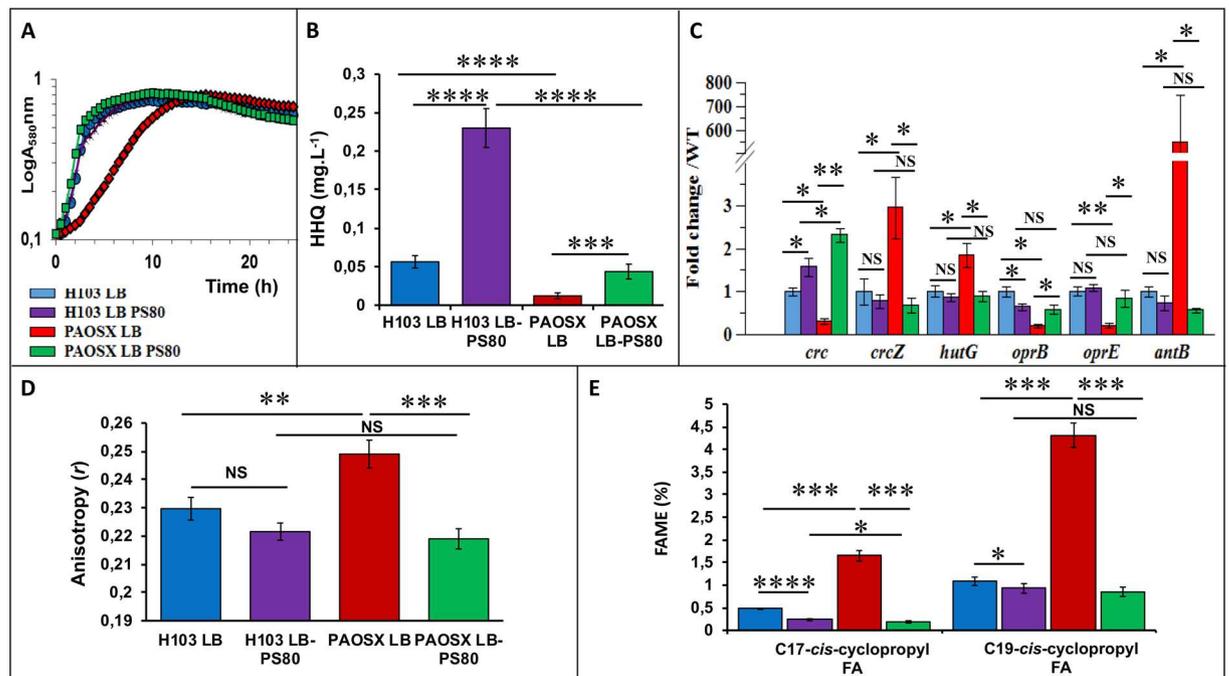


Figure 4. Polysorbate 80 (PS80) restores PAOSX growth, HHQ production, expression of Crc-Hfq target genes, and membrane alterations. (A) Growth kinetics of H103 (blue, purple) and PAOSX (red, green) grown in LB or LB-PS80, respectively. (B) Quantification of HHQ production by LC/MS of H103 (blue, purple) and PAOSX (red, green) grown in LB or LB-PS80, respectively. (C) qRT-PCR assayed on RNAs extracted from H103 (blue, purple) and PAOSX (red, green) grown in LB or LB-PS80, respectively. (D) Membrane fluidity (fluorescence anisotropy) of H103 (blue, purple) and PAOSX (red, green) grown in LB or LB-PS80, respectively. (E) Percentage of C_{17} and C_{19} cyclopropyl fatty acids (FAME analysis) extracted from H103 (blue, purple) and PAOSX (red, green) grown in LB or LB-PS80, respectively. Statistics were achieved by unpaired t-test: **** $p < 0.0001$; *** $p = 0.0001$ to 0.001 ; ** $p = 0.001$ to 0.01 ; * $p = 0.01$ to 0.05 ; NS (Not significant), $p \geq 0.05$.

be used to allow microorganisms to uptake some nutrients they are unable to transport, as in the case of glucose in the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*⁴⁷. The growth of PAOSX in LB was strongly affected compared to that of H103, but this growth defect was almost totally suppressed by the addition of PS80 to LB (LB-PS80) (Fig. 4A). Similarly, the HHQ production decrease observed in PAOSX was restored to near WT level when the mutant strain was grown in LB-PS80 (Fig. 4B). We further investigated the effect of PS80 on the activity of Crc/Hfq/CbrAB networks by qRT-PCR on some selected target genes. When the *sigX* mutant was grown in LB-PS80, their expression level was restored at least partly to the WT level (Fig. 4C). Specifically, the expression of CrcZ was drastically and significantly reduced upon addition of the surfactant, suggesting that CbrA/B became less active. Consistently, the transcript levels of some members of the CbrAB, Crc and Hfq regulons, including *antB*, *hutG*, *oprE* or *oprB*, were also restored to WT levels, confirming the stimulation of CCR by PS80 in PAOSX. This was particularly spectacular in the case of *antB*, for which the decrease in the transcript level was dramatic. On the opposite, PS80 had no drastic effects on H103 growth (Fig. 4A) and Crc/Hfq/CbrAB-selected targets expression (Fig. 4C), excepted for HHQ, which amount was about 5-fold increased in presence of the detergent (Fig. 4B). These data raise the question of the mechanism by which PS80 acts on *P. aeruginosa*. Noticeably, it was previously shown that many Crc- and/or Hfq-repressed genes were expressed at a higher level when *P. putida* was grown in LB at 10°C compared to 30°C ⁴⁸. This was particularly the case for genes encoding proteins that are involved in transport and metabolism of some non-preferred carbon sources, suggesting that CCR may be less effective at low temperature. Interestingly, a *lptA* mutant (affected in phospholipid biosynthesis) displayed a lower membrane fluidity and a reduced PQS production⁴⁹. Since cold-induced stress reduces membrane fluidity, and because a SigX overproducing strain displays an increased membrane fluidity¹¹, we further investigated the effect of PS80 on the fatty acids composition of PAOSX membranes and its impact on membrane fluidity.

Altered membrane lipid composition and fluidity may explain the dysregulation of metabolic networks in the *sigX* mutant. Membrane fluidity of H103 and PAOSX grown in LB and LB-PS80 was measured by anisotropy assays. Anisotropy of the *sigX* mutant was significantly higher than that of H103, confirming the lower membrane fluidity of PAOSX (Fig. 4D), in agreement with previous results, in which a SigX overproducing strain displayed a lower anisotropy compared to its corresponding WT strain, reflecting an increased membrane fluidity of this strain¹¹. While no significant effect was observed in case of H103, (despite a slight increased membrane fluidity tendency), addition of 0.1% of PS80 restored the membrane fluidity of PAOSX to a level similar of that of the WT grown in LB or LB-PS80 (Fig. 4D). Interestingly, previous studies performed on plant cells showed that FAs externally added to the medium can be incorporated into phospholipidic

% FA	H103 LB	H103 LB-PS80	PAOSX LB	PAOSX LB-PS80
C16:0	38.42 ± 0.15	32.23 ± 1.58	36.41 ± 0.35	32.68 ± 0.65
C16:1Δ9- <i>trans</i>	1.32 ± 0.51	2.07 ± 0.36	1.37 ± 0.32	2.7 ± 1.0
C16:1Δ9- <i>cis</i>	12.39 ± 0.23	2.62 ± 0.07	7.51 ± 0.14	1.83 ± 0.07
C17- <i>cis</i> -cyclopropyl	0.47 ± 0.013	0.23 ± 0.022	1.65 ± 0.11	0.19 ± 0.02
C18:0	2.66 ± 0.31	2.93 ± 1.2	3.39 ± 0.92	3.05 ± 0.46
C18:1- <i>trans</i>	0.55 ± 0.43	0	0	0
C18:1Δ9- <i>cis</i>	0	44.07 ± 3.35	0	45.56 ± 2.71
C18:1Δ11- <i>cis</i>	43.1 ± 0.75	14.92 ± 1.6	45.36 ± 0.75	13.15 ± 2.11
C19- <i>cis</i> -cyclopropyl	1.08 ± 0.03	0.93 ± 0.11	4.31 ± 0.26	0.85 ± 0.10

Table 1. Percentage of fatty acids species extracted from *P. aeruginosa* H103 and its isogenic *sigX* mutant strain PAOSX grown in LB or LB-PS80.

membranes. PS80, which harbours in its hydrophobic part an esterified long-chain FA that is structurally related to C18Δ9 FA, can partially rescue the phenotype of an *Arabidopsis* mutant impaired in FA synthesis⁵⁰. Since bacteria have the capacity to increase the fluidity of their membrane bilayer *via* the incorporation of more unsaturated FAs, or FA with analogous properties⁵¹, it is conceivable that addition of PS80 may restore, at least partly, the *sigX* mutant FAs content.

The main FAs identified in H103 WT strain were C18:1Δ11 *cis*-unsaturated fatty acid (UFA, 43%), C16:0 FA (38%) and C16:1Δ9 *cis*-UFA (12%), as previously reported^{9,11}, while other FAs were poorly represented (below 3%) (Table 1). Compared to H103, the *sigX* mutant displayed lower percentage of C16:0 and C16:1Δ9 *cis*-UFA and a slight increase in C18:1Δ11 *cis* (Δ11) UFA, in line with a previous study showing that a *sigX*-overproducing PA14 strain displayed opposite percentages of these FA species¹¹. However, as the degree of FA saturation was not strongly modified in PAOSX (0.73) compared to H103 (0.72), other factors may account for its lower membrane fluidity. Notably, the *sigX* mutant strain displayed also higher relative ratios of C17 and C19-*cis*-cyclopropyl containing FA (Table 1, Fig. 4E). These FAs decrease the mobility of reporter molecules within a membrane, and increase the tightness of packing within lipid bilayers, characteristics of a more rigid membrane⁵². The FA content of the *sigX* mutant was strongly modified when grown in LB-PS80. Thus, C18Δ9, the FA moiety of PS80 was over-represented in PAOSX exposed to PS80 (about 45% of the total FA content), suggesting a direct insertion of the molecule into its membranes. In addition, while the contents of C18:1Δ11 *cis* and C16:1Δ9 *cis* UFAs were strongly reduced (to about 12% and 1.8%, respectively), possibly a result of PS80 incorporation, the degree of FA saturation was globally lowered (0.57). Noticeably, PS80 modified also H103 membrane composition, leading to similar FA species amounts as in case of PAOSX grown in LB-PS80 (Table 1). Interestingly, PS80 addition reduced strongly the proportion of C17 and C19-*cis*-cyclopropyl containing FAs in PAOSX, and to lesser extent in H103 membranes (Fig. 4E). As a result, PAOSX and H103 grown in LB-PS80 displayed a similar membrane fluidity that can be related to similar FA composition and proportion. FA cyclopropanation is generally assumed to enhance the chemical and physical stability of membranes⁵³. This adaptation was shown to occur in bacteria facing adverse environmental conditions⁵⁴, such as tolerance to high osmotic pressure, high temperature, low pH, or nutrient deprivation. Altogether, these data suggest that addition of PS80 increased membrane fluidity in the *sigX* mutant, restoring at least some membrane functionalities that could be involved in CCR.

Concluding remarks. *SigX* is a multifaceted major ECF sigma factor of the RpoE-like family⁴ that has been proposed to maintain membrane functionality homeostasis^{9,11,13}, in response to envelope stress signals⁵⁻⁷. This function is further supported by the fact that the Gram-positive *Bacillus subtilis* ECF sigma factor σW, which shares strong similarity with *SigX*, is a membrane-fluidity homeostasis regulator⁵⁵. Similarly, the absence of *SigX* results in reduced membrane fluidity, a change that could alter the anchorage and/or the activity of some membrane transporters involved in nutrient uptake. Since CCR is only observed when the preferred carbon source is present at concentrations that do not limit growth, or at least when it is present in excess relative to other nutrients, it is possible that the reduced membrane fluidity of the *sigX* mutant may account, at least partly, for the reduced CCR that was observed in this strain during growth in LB, for instance by disturbing the activity of the CbrA membrane protein. Taken together, these data suggest that *SigX* is indirectly involved in CCR regulation, possibly via its effects on membrane integrity and fluidity (Fig. 5). How membrane fluidity can impact on the regulators that are involved in CCR (*Crc/Hfq/CrcZ*) is however not a trivial question. Further investigations are required to explore this hypothesis.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. The strains used in this study were *P. aeruginosa* H103 (the prototrophic sequenced isolate strain PAO1)⁵⁶ and its isogenic *sigX* deletion mutant PAOSX⁷. Bacteria were grown in LB containing 171 mM (10 g. L⁻¹) NaCl on a rotary shaker (180 rpm) at 37 °C; growth was followed by A₅₈₀ determination. When required, *P. aeruginosa* strains were grown in LB containing 0.1% polysorbate 80 (LB-PS80). For microaerobic growth, H103 and PAOSX were grown in LB containing 100 mM KNO₃ during 24 h in static condition in microtiter plates (250 μl per well).

Extraction of RNA, reverse transcription and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Bacteria were grown in LB broth to mid-log phase (A₅₈₀ = 0.4) before RNA extraction. Total RNA was prepared by the hot

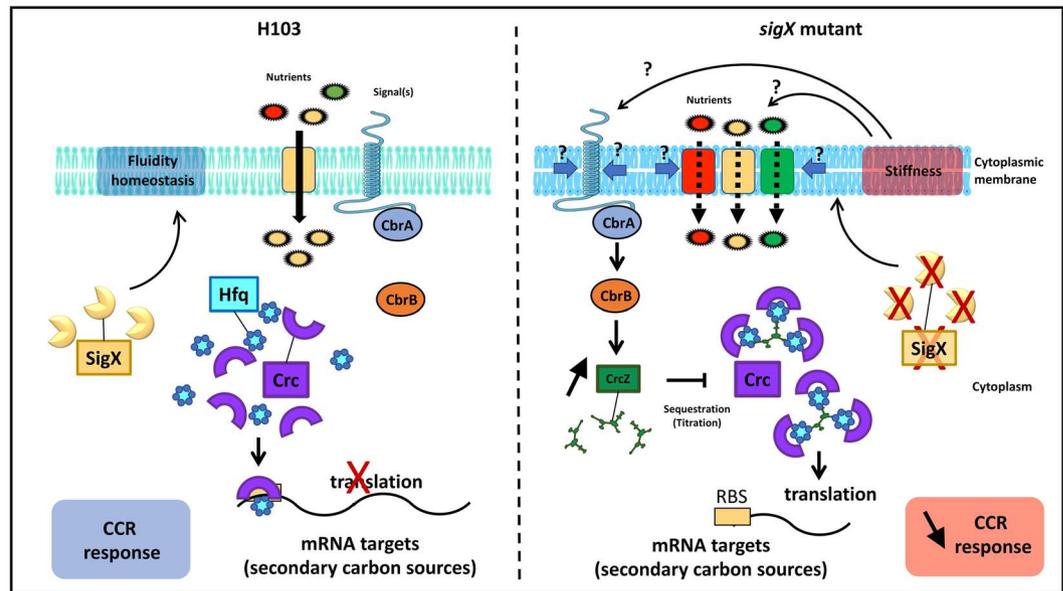


Figure 5. Membrane stiffness may account for lower CCR in the *sigX* mutant. In *P. aeruginosa* H103 grown in LB, in which the preferred carbon sources are present in non-limiting concentrations, CCR occurs through the Hfq/Crc/CrcZ pathway leading to repression of catabolite genes required for the consumption of other carbon sources^{31,33,36}. The absence of SigX results in reduced membrane fluidity, a change that could disturb CbrA sensor activity, alter the anchorage and/or the activity of some membrane transporters and/or sensors involved in nutrient uptake. SigX seems thus to be indirectly involved in CCR regulation, possibly via its effects on membrane integrity and fluidity.

acid-phenol method as previously described⁷, with minor modifications. Briefly, cells were lysed, and RNA was extracted two times with an equal volume of acidic hot phenol and once with chloroform. RNA was ethanol precipitated, air dried, and dissolved in DEPC-treated water. Contaminating DNA was removed from total RNA by using 2 U of RNase-free TURBO DnaseI (Invitrogen) in a 50- μ l mixture containing 6.25 mM MgCl₂ and approximately 3 μ g/ μ L⁻¹ of total RNA. The reaction mixture was incubated 30 min at 37 °C, and DNase I was inactivated by adding 1 μ L of 0.5 M EDTA for 10 min at 65 °C. The RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) experiments were conducted as previously described⁵⁷, using primers listed in Supplementary Table S4.

Transcriptome analysis. The RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm, and the quality of the RNA was assessed by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000) and checked on a 1.2% agarose gel prior to use. Only samples showing A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios above 2.0 were selected. RNA quality was then assessed with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Samples having an RNA Integrity Number (RIN) of 9 were retained. Ten μ g of total RNA were used for each replicate with random hexamer primers (Invitrogen) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) for cDNA synthesis, fragmentation and labelling. Hybridizations were performed at the Genome Québec Innovation Centre (McGill University, Montréal, Canada). Raw data were corrected for background signals using the RMA algorithm and quantile normalization⁵⁸. Raw data were deposited to the Gene Expression Omnibus (GEO) public database (NCBI) under series entry “GSE117438”. Expression levels obtained from three replicates for each condition were compared using the FlexArray 1.3 software (Génome Québec, Mac Gill University). The 758 genes showing a P-value < 0.05 using the Empirical Bayes algorithm⁵⁹, were further considered. Since the RMA algorithm decreases the false positive rate and compresses the fold change, a 2-fold change cut-off value was used for the determination of differentially expressed genes. Expression data for all differentially expressed genes is available in Supplementary Table S1. For microarrays validation, quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) experiments were conducted⁵⁷ using primers described in Supplementary Table S4. PCR reactions were performed in triplicate and the standard deviations were lower than 0.15 CT.

Proteomic analyses. Bacteria were grown in LB broth to mid-log phase ($A_{580} = 0.4$). Total proteins were extracted, quantified and digested as previously described⁶⁰. All experiments were performed on a LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) coupled to an Easy nLC II system (Thermo Scientific). One microliter of sample was injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific). The separation was performed with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos, Japan). The mobile phase consisted of H₂O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and CH₃CN/FA 0.1% (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 in and 11 min at 80% B. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision induced

dissociation) method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer ($R = 60,000$) with the mass range m/z 400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS^2 experiments. Singly charged species were excluded for MS^2 experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s, with a repeat count of 1, a repeat duration of 30 s and an exclusion mass width of ± 10 ppm. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with collision energy of 35%. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclorosiloxane). After MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. Peptide features presenting a p -value and a q -value less than 0.05, and a power greater than 0.8 were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science) against the database restricted to *P. aeruginosa* PA01 (<http://www.pseudomonas.com>). Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage site allowed; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. Peptides with scores above 20 were imported into Progenesis. For each condition, the total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of peptides. Proteins identified with less than 2 peptides were discarded. Only the proteins which varied by 2-fold in these average normalized abundances between growth conditions were retained. Expression data for all differentially expressed proteins is available in Supplementary Table S2.

Functional profiling. The enrichment factor (EF) was calculated by comparing normalized PseudoCAP classes experimentally detected and normalized PseudoCAP classes annotated using the following formula: $EF = (\text{number of specific PseudoCAP classes detected} / \text{number of all PseudoCAP classes detected}) / (\text{number of specific PseudoCAP classes annotated} / \text{number of all PseudoCAP classes annotated})$. Functional categories displaying an $EF \geq 1.5$ are defined as overrepresented in the functional transcriptomic or proteomic profiling of the sigX mutant.

Anisotropy measurements. Fluorescence anisotropy analysis of *P. aeruginosa* cells grown to mid-log phase ($A_{580} = 0.4$) were performed as previously described⁶¹ with few modifications. Cell pellets were washed two times ($7500 \times g$, 5 min, 25 °C) in 10 mM $MgSO_4$ and resuspended in the same wash solution to reach an A_{580} of 0.1. One μL of a 4 mM of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) stock solution (Sigma-Aldrich) in tetrahydrofuran was added to 1 mL aliquot of the resuspended cultures and incubated in the dark for 30 min at 37 °C to allow the probe to incorporate into the cytoplasmic membrane. Measurement of the fluorescence polarization was performed using the Spark 20 M multimode Microplate Reader, equipped with an active temperature regulation system (Te-Cool™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Excitation and emission wavelengths were set to 365 and 425 nm, respectively, and the anisotropy (r) was calculated according to Lakowicz⁶². Three measurements were performed for each sample and data were recorded using SparkControl™ software (Version 2.1, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The relationship between fluorescence polarization and membrane fluidity is an inverse one, where increasing anisotropy values correspond to a more rigid membrane and vice versa. All values are reported as means of triplicate analyses for each experimental variable.

Lipids extraction and fatty acids methyl ester (FAME) analysis. Bacterial aliquots were collected in triplicate at the mid-log phase ($A_{580} = 0.4$) and pelleted by centrifugation. After removal of supernatant and three washes with sterile saline solution, bacteria were centrifuged at 4 °C ($13,000 \times g$) for 15 minutes. Aliquots were resuspended in deionized water and lyophilized using a Heto PowerDry PL9000-50/HSC500 Freeze Dryer (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared by incubation for 15 min at 95 °C in a mix of 14% boron trifluoride (BF_3)/methanol followed by extraction with hexane as described by Morrison and Smith⁶³. FAMES were separated and analyzed by gas chromatography (GC) coupled to flame ionization detection using an Agilent Technology, 6890 Network GC System, equipped with a split/splitless 7683 Series Injector. The samples were separated through a CP-Sil 88 capillary column (Chrompack, Middelburg, the Netherlands; length, 50 m; inner diameter, 0.25 mm; 0.25 mm film). FAMES were identified by co-injection of reference standards obtained from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA) and were quantified on basis of their peak areas in total ion counts. The degree of FA saturation was determined as the ratio between the saturated FAs and the unsaturated FAs⁶⁴. All experiments were performed in triplicate.

Extraction and quantification of 2-alkyl-4-hydroxyquinolines (HAQs). 2-heptyl-4-hydroxyquinolone (HHQ) was extracted from cells grown to $OD_{580} = 0.4$ and quantified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), as previously described⁶⁵. Briefly, samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a C8 reverse-phase column (Eclipse XDB-C8, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada), and the detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). The column was a 4.6×250 mm Agilent XDB-C8 column (particle size, 5 mm). The mobile phase was composed of water and acetonitrile containing 1% acetic acid. The initial solvent composition was 80% water: 20% acetonitrile, which was linearly changed to 2% water: 98% acetonitrile in 28 min, kept stable for an additional 6 min, returned to the initial values in 1 min, and finally left to stabilize for another 3 min. The flow rate was 0.4 ml/min, which was split to 40 μL through a Valco Tee splitter. The volume of the sample injected was 20 μL . The analyses were performed in positive electrospray ionization mode. The capillary voltage was 3 kV and the cone voltage, 21 V. The source temperature was 120 °C. Nitrogen was used as a nebulizing and drying gas at flow rates of 20 and 200 ml/min, respectively. Data were collected in Selective Ion Detection (SID) mode using the m/z 260 and 264 ions. Quantification of HHQ in bacterial cultures was performed by measuring the relative area of the chromatograms of the pseudomolecular ions of HHQ and of the internal standard

(5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4)) and multiplying the ratio by the concentration of the internal standard added.

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated using Prism GraphPad online tool (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). The data were statistically analyzed using two-sample unpaired *t*-test to calculate *p* values. The mean with SD or SEM were calculated and plotted.

VennDiagrams generation. Venn diagrams and hypergeometric testing to assess the significance of the overlap were created using the *VennDiagram* R package (<https://cran.r-project.org/package=VennDiagram>)⁶⁶. RNA-seq data of the *P. aeruginosa* PA14 *sigX* mutant and the PA14 overexpressing *SigX*⁹ were retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) database using the accession number GSE50937. The transcriptomic profiling data of the *P. aeruginosa* PAO1 *sigX* mutant⁸ were retrieved from the Supplementary Table S1. The proteomic data of the *P. aeruginosa* PA14 strain overexpressing *SigX*¹¹ were collected from Table 1 and Supplementary Table S2. The *P. aeruginosa* PAO1 orthologous genes/proteins of *P. aeruginosa* PA14 strain were identified using the reciprocal best Basic Local Alignment Search Tool hits implemented in the OrtholugeDB⁶⁷. The transcriptomic and proteomic data obtained in this study and the all sets of collected data were used to draw the Venn diagrams displayed in the Supplementary Fig. S2.

References

- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051–1060 (2000).
- Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964, <https://doi.org/10.1038/35023079> (2000).
- Staron, A. *et al.* The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* **74**, 557–581, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06870.x> (2009).
- Chevalier, S. *et al.* Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.008> (2018).
- Bouffartigues, E. *et al.* Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor *SigX*. *FEMS Microbiol Lett* **356**, 193–200, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12482> (2014).
- Bouffartigues, E. *et al.* The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front Microbiol* **6**, 630, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00630> (2015).
- Bouffartigues, E. *et al.* Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the *SigX* sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* **194**, 4301–4311, <https://doi.org/10.1128/JB.00509-12> (2012).
- Gicquel, G. *et al.* The extra-cytoplasmic function sigma factor *SigX* modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**, e80407, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080407> (2013).
- Blanka, A. *et al.* Identification of the alternative sigma factor *SigX* regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* **196**, 345–356, <https://doi.org/10.1128/JB.01034-13> (2014).
- Schulz, S. *et al.* Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog* **11**, e1004744, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004744> (2015).
- Boechat, A. L., Kaihami, G. H., Politi, M. J., Lepine, F. & Baldini, R. L. A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**, e84775, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084775> (2013).
- Nicholson, W. L. Increased competitive fitness of *Bacillus subtilis* under nonsporulating conditions via inactivation of pleiotropic regulators AlrR, SigD, and SigW. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3500–3503, <https://doi.org/10.1128/AEM.07742-11> (2012).
- Duchesne, R. *et al.* A proteomic approach of *SigX* function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J Proteomics* **94**, 451–459, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.022> (2013).
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**, 8746–8749, <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07> (2007).
- Wood, L. F. & Ohman, D. E. Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **72**, 183–201, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06635.x> (2009).
- Winsor, G. L. *et al.* Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* **44**, D646–653, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227> (2016).
- Chevalier, S. *et al.* Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev* **41**, 698–722, <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020> (2017).
- Teitzel, G. M. *et al.* Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 7242–7256, <https://doi.org/10.1128/JB.00837-06> (2006).
- Fowler, R. C. & Hanson, N. D. The OpdQ porin of *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by environmental signals associated with cystic fibrosis including nitrate-induced regulation involving the NarXL two-component system. *Microbiologyopen* **4**, 967–982, <https://doi.org/10.1002/mbo3.305> (2015).
- Kim, S. K., Im, S. J., Yeom, D. H. & Lee, J. H. AntR-mediated bidirectional activation of *antA* and *antR*, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **505**, 146–152, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.004> (2012).
- Kukor, J. J., Olsen, R. H. & Ballou, D. P. Cloning and expression of the *catA* and *catB* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **170**, 4458–4465 (1988).
- Diggle, S. P. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**, 87–96, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014> (2007).
- Hoschle, B., Gnau, V. & Jendrossek, D. Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**, 3649–3656, <https://doi.org/10.1099/mic.0.28260-0> (2005).
- Zhang, X. X. & Rainey, P. B. Genetic analysis of the histidine utilization (*hut*) genes in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* **176**, 2165–2176, <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075713> (2007).
- Arai, H. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **2**, 103, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00103> (2011).
- Osamura, T., Kawakami, T., Kido, R., Ishii, M. & Arai, H. Specific expression and function of the A-type cytochrome c oxidase under starvation conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **12**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177957> (2017).
- Van Alst, N. E., Sherrill, L. A., Iglewski, B. H. & Haidaris, C. G. Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Can J Microbiol* **55**, 1133–1144, <https://doi.org/10.1139/w09-065> (2009).
- Schreiber, K. *et al.* The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* **189**, 4310–4314, <https://doi.org/10.1128/JB.00240-07> (2007).

29. Jiang, Y., Tang, H., Wu, G. & Xu, P. Functional Identification of a Novel Gene, *moaE*, for 3-Succinoylpyridine Degradation in *Pseudomonas putida* S16. *Sci Rep* **5**, 13464, <https://doi.org/10.1038/srep13464> (2015).
30. Perinet, S. *et al.* Molybdate transporter ModABC is important for *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection. *BMC Res Notes* **9**, 23, <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1840-x> (2016).
31. Sonnleitner, E. & Blasi, U. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet* **10**, e1004440, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004440> (2014).
32. La Rosa, R., Behrends, V., Williams, H. D., Bundy, J. G. & Rojo, F. Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **18**, 807–818, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13126> (2016).
33. Sonnleitner, E., Romeo, A. & Blasi, U. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA Biol* **9**, 364–371, <https://doi.org/10.4161/rna.19231> (2012).
34. Sonnleitner, E., Prindl, K. & Blasi, U. The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation. *PLoS One* **12**, e0180887, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180887> (2017).
35. Linares, J. F. *et al.* The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**, 3196–3212, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02292.x> (2010).
36. Sonnleitner, E. *et al.* Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, e44637 (2012).
37. Valentini, M. & Lapouge, K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4 -dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol* **15**, 1707–1716, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12056> (2013).
38. Milojevic, T., Grishkovskaya, I., Sonnleitner, E., Djinic-Carugo, K. & Blasi, U. The *Pseudomonas aeruginosa* catabolite repression control protein Crc is devoid of RNA binding activity. *PLoS One* **8**, e64609, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064609> (2013).
39. Sonnleitner, E. *et al.* Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **46**, 1470–1485, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1245> (2018).
40. Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E. P. & Blasi, U. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**, 1542–1558, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05032.x> (2006).
41. Kambara, T. K., Ramsey, K. M. & Dove, S. L. Pervasive Targeting of Nascent Transcripts by Hfq. *Cell Rep* **23**, 1543–1552, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.134> (2018).
42. Sonnleitner, E., Abdou, L. & Haas, D. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 21866–21871, <https://doi.org/10.1073/pnas.pnas.0910308106> (2009).
43. Abdou, L., Chou, H.-T., Haas, D. & Lu, C.-D. Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**, 2784–2792 (2011).
44. Itoh, Y., Nishijyo, T. & Nakada, Y. Histidine catabolism and catabolic regulation. In: Ramos, J.-L. & Filloux, A., editors. *Pseudomonas - A model system in biology*, volume 5. *Dordrecht: Springer*, 371–395 (2007).
45. Rojas-Rosas, O., Villafana-Rojas, J., Lopez-Dellamary, F. A., Nungaray-Arellano, J. & Gonzalez-Reynoso, O. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. *Can J Microbiol* **53**, 840–851, <https://doi.org/10.1139/W07-023> (2007).
46. La Rosa, R., de la Pena, F., Prieto, M. A. & Rojo, F. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environ Microbiol* **16**, 278–290, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12303> (2014).
47. Briczinski, E. P., Phillips, A. T. & Roberts, R. F. Transport of glucose by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* occurs via facilitated diffusion. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6941–6948, <https://doi.org/10.1128/AEM.01280-08> (2008).
48. Fonseca, P., Moreno, R. & Rojo, F. *Pseudomonas putida* growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environ Microbiol* **15**, 24–35, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02708.x> (2013).
49. Baysse, C. *et al.* Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* **151**, 2529–2542, <https://doi.org/10.1099/mic.0.28185-0> (2005).
50. Terzaghi, W. B. Manipulating membrane Fatty Acid compositions of whole plants with tween-Fatty Acid esters. *Plant Physiol* **91**, 203–212 (1989).
51. de Mendoza, D. Temperature sensing by membranes. *Annu Rev Microbiol* **68**, 101–116, <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103612> (2014).
52. Pandit, K. R. & Klauda, J. B. Membrane models of *E. coli* containing cyclic moieties in the aliphatic lipid chain. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1205–1210, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.009> (2012).
53. Poger, D. & Mark, A. E. A ring to rule them all: the effect of cyclopropane Fatty acids on the fluidity of lipid bilayers. *J Phys Chem B* **119**, 5487–5495, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00958> (2015).
54. Grogan, D. W. & Cronan, J. E. Jr. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 429–441 (1997).
55. Kingston, A. W., Subramanian, C., Rock, C. O. & Helmann, J. D. A sigmaW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. *Mol Microbiol* **81**, 69–79, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07679.x> (2011).
56. Hancock, R. E., Decad, G. M. & Nikaido, H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biochim Biophys Acta* **554**, 323–331 (1979).
57. Guyard-Nicodeme, M. *et al.* Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *J Proteome Res* **7**, 1218–1225, <https://doi.org/10.1021/pr070539x> (2008).
58. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264, <https://doi.org/10.1093/biostatistics/4.2.249> (2003).
59. Wright, G. W. & Simon, R. M. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics* **19**, 2448–2455 (2003).
60. Clamens, T. *et al.* The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Sci Rep* **7**, 41178, <https://doi.org/10.1038/srep41178> (2017).
61. Vincent, M., England, L. S. & Trevors, J. T. Cytoplasmic membrane polarization in Gram-positive and Gram-negative bacteria grown in the absence and presence of tetracycline. *Biochim Biophys Acta* **1672**, 131–134, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.005> (2004).
62. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (2006).
63. Morrison, W. R. & Smith, L. M. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride–Methanol. *J Lipid Res* **5**, 600–608 (1964).
64. Heipieper, H. J., Meulenbeld, G., van Oirschot, Q. & de Bont, J. Effect of Environmental Factors on the trans/cis Ratio of Unsaturated Fatty Acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2773–2777 (1996).
65. Lépine, F., Deziel, E., Milot, S. & Rahme, L. G. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* **1622**, 36–41 (2003).
66. Chen, H. & Boutros, P. C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-35> (2011).
67. Whiteside, M. D., Winsor, G. L., Laird, M. R. & Brinkman, F. S. OrthologDB: a bacterial and archaeal orthology resource for improved comparative genomic analysis. *Nucleic Acids Res* **D366–76**, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1241> (2013).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Campus France, The FUNAI, the Evreux Portes de Normandie, the Conseil Général de l'Eure, the Région Normandie and European Union (FEDER).

Author Contributions

M.F., R.D., A.T., E.B., S.D., J.H., C.L., O.M., D.T., C.O.A., M.C.F., G.G., H.H. and M.C.G. performed the experiments. R.D., M.C.F., T.C., J.H., E.B., P.C. and S.C. performed and analyzed proteomic experiments. R.D., O.M., G.G., E.B., M.C.G., E.D., P.C. and S.C. performed and analyzed transcriptomic experiments. A.T., M.C.G. and E.D. performed and analyzed H.A.Q. experiments. C.D.P., S.D., C.L., H.H. performed and analyzed FAME experiments. A.T., E.B., O.M., D.T., C.O.A. performed and analyzed anisotropy experiments. S.C. and E.B. conceived and designed the experiments. M.F., R.D., E.B., M.G.J.F., O.L., T.C., C.O.A., E.D., H.H., P.C. and S.C. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35503-3>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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



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

© The Author(s) 2018

II. Annexe 2. Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation.

J'ai contribué à cet article par la détermination des concentrations minimales inhibitrices par E-Test sur les souches H103 et PAOSX (données non montrées dans l'article), en participant à l'obtention des images de microscopie confocale pour la détermination des concentrations sub-inhibitrices de Tobramycine, et par la relecture du manuscrit.

ARTICLE OPEN

Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation

Ali Tahrioui¹, Rachel Duchesne¹, Emeline Bouffartigues¹, Sophie Rodrigues¹, Olivier Maillot¹, Damien Tortuel¹, Julie Hardouin², Laure Taupin³, Marie-Christine Groleau⁴, Alain Dufour³, Eric Déziel⁴, Gerald Brenner-Weiss⁵, Marc Feuilloley¹, Nicole Orange¹, Olivier Lesouhaitier¹, Pierre Cornelis¹ and Sylvie Chevalier¹

Biofilms are structured microbial communities that are the leading cause of numerous chronic infections which are difficult to eradicate. Within the lungs of individuals with cystic fibrosis (CF), *Pseudomonas aeruginosa* causes persistent biofilm infection that is commonly treated with aminoglycoside antibiotics such as tobramycin. However, sublethal concentrations of this aminoglycoside were previously shown to increase biofilm formation by *P. aeruginosa*, but the underlying adaptive mechanisms still remain elusive. Herein, we combined confocal laser scanning microscope analyses, proteomics profiling, gene expression assays and phenotypic studies to unravel *P. aeruginosa* potential adaptive mechanisms in response to tobramycin exposure during biofilm growth. Under this condition, we show that the modified biofilm architecture is related at least in part to increased extracellular DNA (eDNA) release, most likely as a result of biofilm cell death. Furthermore, the activity of quorum sensing (QS) systems was increased, leading to higher production of QS signaling molecules. We also demonstrate upon tobramycin exposure an increase in expression of the PrrF small regulatory RNAs, as well as expression of iron uptake systems. Remarkably, biofilm biovolumes and eDNA relative abundances in *pqs* and *prrF* mutant strains decrease in the presence of tobramycin. Overall, our findings offer experimental evidences for a potential adaptive mechanism linking PrrF sRNAs, QS signaling, biofilm cell death, eDNA release, and tobramycin-enhanced biofilm formation in *P. aeruginosa*. These specific adaptive mechanisms should be considered to improve treatment strategies against *P. aeruginosa* biofilm establishment in CF patients' lungs.

npj Biofilms and Microbiomes (2019)5:15; <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0088-3>

INTRODUCTION

Bacterial biofilm forms a highly structured community of cells that are attached to each other and/or a surface and are enclosed in a complex matrix of extracellular polymeric substances (EPS).^{1,2} Biofilms enable bacteria to colonize different environments and are prevalent in natural, industrial and medical environments. Importantly, biofilms have emerged as critical in chronic infections. The traits of bacteria within biofilms are distinct from those of their planktonic counterparts, which include an increased resistance to both biocide agents and antibiotics, the development of physical and social interactions, enhanced rate of gene exchange and selection for phenotypic variants.^{3,4} In many bacterial species, biofilm formation responds to a variety of environmental cues including nutritional availability, host-derived signals or, in some cases, to nonlethal concentrations of antibiotics.^{5–8} The process of biofilm development is coordinated by molecular pathways involving second-messenger signaling, cell-to-cell quorum sensing (QS) signaling, two-component systems and small noncoding RNAs (sRNAs).⁶ Interestingly, antibiotics at levels below the minimal inhibitory concentration (referred to hereafter as sub-MIC) have the ability to trigger the

alteration of multiple physiological processes including biofilm formation, virulence, and gene expression, which can lead to bacterial genetic and phenotypic resistance.^{9–12} Sub-MICs of antibiotics with different chemical structures and modes of action induce biofilm formation in common clinical pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, among others.^{5,11}

P. aeruginosa is a problematic Gram-negative pathogen representing a serious threat to individuals and public health. This opportunistic pathogen causes both acute and chronic infections that are strongly related to its planktonic and biofilm lifestyles, respectively. Within the lungs of cystic fibrosis (CF) individuals, biofilms are gradually formed by *P. aeruginosa* cells surrounded by a self-produced matrix of EPS such as polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA), metabolites, and siderophores.^{2,13–15} As a result of their ability to form biofilms and their high tolerance levels towards a broad spectrum of antimicrobials, *P. aeruginosa* chronic lung infections are almost impossible to eradicate.^{13,16,17} Tobramycin, an aminoglycoside antibiotic, is used in the treatment of *P. aeruginosa* infections.¹⁸ However, exposure to sub-MIC of this aminoglycoside^{19–22} and of

¹Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, LMSM EA4312, Normandie Université, Université de Rouen Normandie, Évreux, France; ²Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, PBS, Normandie Université, Université de Rouen Normandie, UMR 6270 CNRS, Mont Saint Aignan, France; ³Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, LBCM EA3884, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne-Sud, Lorient, France; ⁴INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada and ⁵Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany
Correspondence: Ali Tahrioui (ali.tahrioui@univ-rouen.fr)

Received: 30 November 2018 Accepted: 1 May 2019

Published online: 23 May 2019

other antibiotics such as quinolones²³ and tetracycline^{20,21} enhances *P. aeruginosa* biofilm formation. Conversely, some other antibiotics such as polymyxin B, carbenicillin, and chloramphenicol, do not impact biofilm development.¹⁹

Based on microarray studies, tobramycin at the sub-MIC dose of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ led to altered expression of genes that are mainly involved in adaptation and protection processes in *P. aeruginosa* grown under planktonic conditions.²¹ Additionally, a recent study assessed the proteome response of planktonic cells of *P. aeruginosa* exposed to 0.1, 0.5, and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ sub-MIC of tobramycin.²⁴ The authors identified higher abundances of multiple heat-shock proteins, proteases and proteins related to amino acid catabolic pathway. In contrast, they observed lower abundances of proteins associated with nucleotide metabolism, tricarboxylic acid (TCA), carbon metabolism and energy derivation, and electron transport activities. A small number of proteins were common to the proteomes produced at different sub-MICs of tobramycin while some proteins showed dose-dependent responses. It is worth to mention that aminoglycosides at sub-MICs can also induce other changes in *P. aeruginosa* physiology, including swimming and swarming motilities and the induction of the type VI secretion system (T6SS).^{20,21} Noteworthy, most of these studies have been conducted on bacteria grown under planktonic conditions. However, since bacteria are thought to adopt predominantly the biofilm lifestyle in nature and in infected host, it is crucial to perform studies on bacteria grown under sessile conditions.

In this context, we sought to elucidate adaptive mechanisms shaping the tobramycin-enhanced biofilm formation in *P. aeruginosa*. Remarkably, our observations support a potential adaptive mechanism in which the 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) molecules and PrrF sRNAs are key players in eDNA release, presumably resulting from cell death which finally trigger changes in the biofilm architecture.

RESULTS

Tobramycin exposure leads to changes in biofilm architecture, biovolume and thickness

Previous studies showed enhanced *P. aeruginosa* biofilm formation upon exposure to tobramycin and other aminoglycosides by using colorimetric assays based on crystal violet staining.^{19–21} To observe the biofilm architectures and to quantify the biovolumes as well as the thicknesses of the biofilms, confocal laser scanning microscopy (CLSM) and COMSTAT image analyses were performed. First, we determined that the MIC of tobramycin for the *P. aeruginosa* wild-type H103 strain is $2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Then, we grew *P. aeruginosa* H103 biofilms in glass bottom microplates under static conditions for 24 h in the presence of $0–2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin. Under our conditions, sub-MICs of tobramycin ($0.5–1 \mu\text{g ml}^{-1}$) increased the presence of three-dimension (3D) structures in the biofilms (Fig. 1a). Consistently, at 0.7, 0.8, and $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ tobramycin, the biofilm biovolumes, the maximum thicknesses, and the average thicknesses reached utmost significant increases

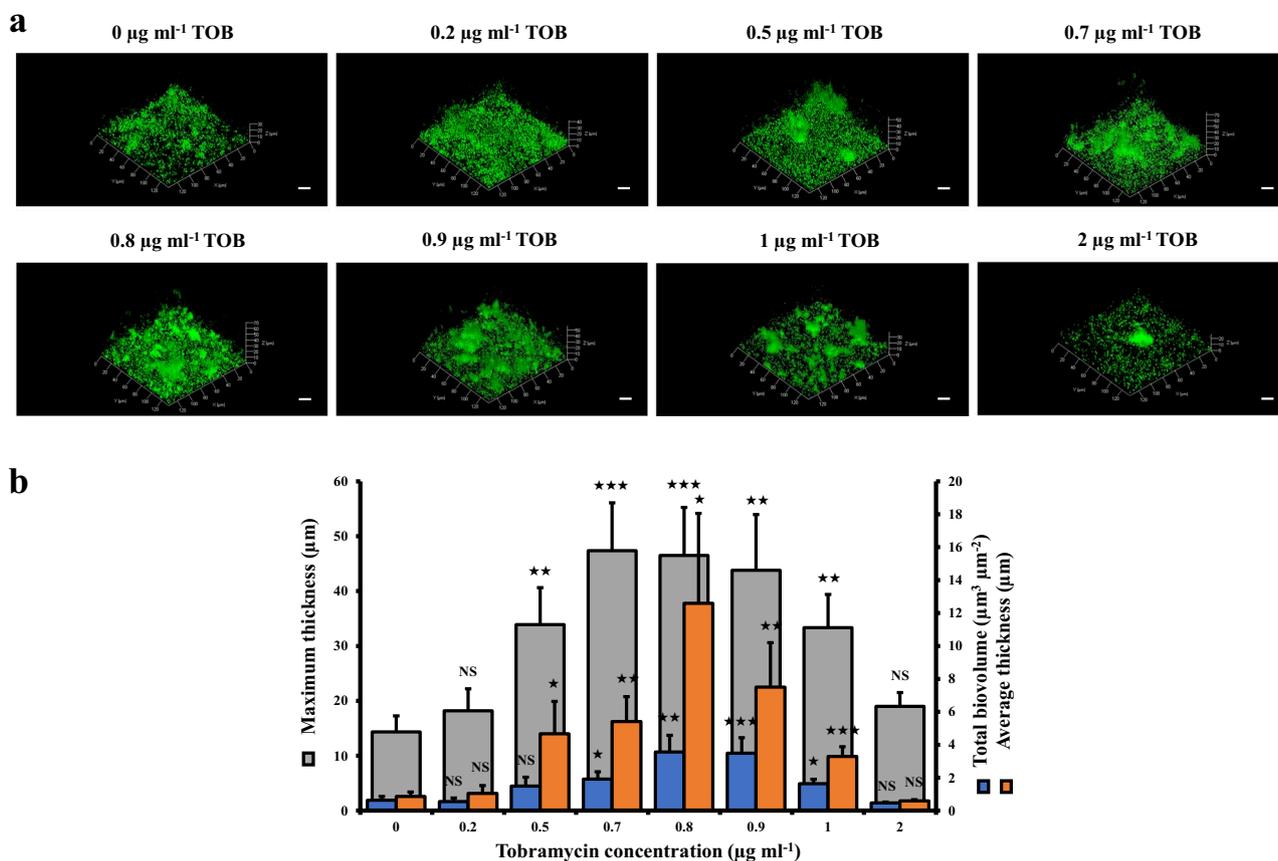


Fig. 1 Effect of sub-MICs of tobramycin on biofilm formation by *P. aeruginosa*. **a** CLSM images of 24-h-old biofilms as a function of different concentrations of tobramycin. For each concentration, a 3D view along the x , y and z axes is displayed. Images show representative data from at least three independent biofilm assays. Scale bars = $20 \mu\text{m}$. **b** COMSTAT image analyses were performed to determine maximum thicknesses (μm), average thicknesses (μm), and total biovolumes ($\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$). The error bars represent the standard error of the means (SEMs) and are the result of the analysis of three views of each of the three independent biological assays. Statistics were achieved by a two-tailed t test: $\star\star\star$, $P = 0.0001$ to 0.001 ; $\star\star$, $P = 0.001$ to 0.01 ; \star , $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (not significant), $P \geq 0.05$

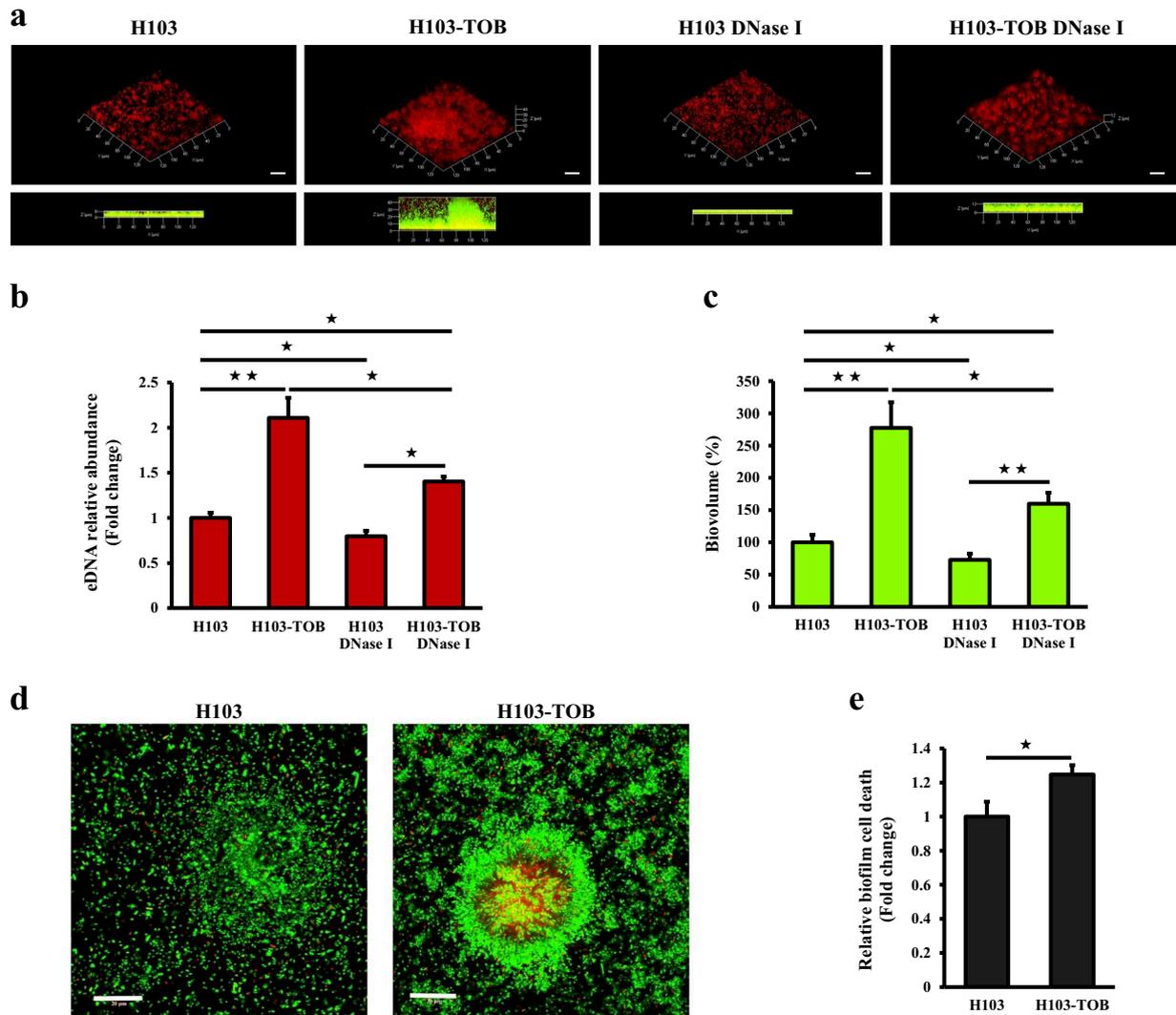


Fig. 2 Sub-MIC of tobramycin leads to increased eDNA release and cell death in *P. aeruginosa* biofilm. **a** Representative CLSM 3D-top and side views of eDNA accumulation in 24-h-old *P. aeruginosa* biofilms exposed to tobramycin ($0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$) alone, DNase I ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) alone or tobramycin and DNase I simultaneously, compared to untreated biofilms. Prior to image acquisition by CLSM, *P. aeruginosa* biofilm cells were labeled in green with SYTO 9 and the eDNA was stained in red with DDAO. Scale bars = $20 \mu\text{m}$. CLSM images were analyzed using the COMSTAT software to quantify **b** the eDNA relative abundances relatively to biofilm biovolume values. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$) and **c** the biofilm biovolumes. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). **d** CLSM micrographs of *P. aeruginosa* biofilms grown in the absence of tobramycin (left panel) and in the presence of drug (right panel) stained using the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit. Green fluorescent cells are viable, whereas red fluorescent cells have compromised cell membranes. Scale bars = $20 \mu\text{m}$. **e** The cell death in biofilms was determined by COMSTAT images analyses. Values of nonviable biovolumes were normalized to total biovolumes. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: ★★, $P = 0.001$ to 0.01 ; ★, $P = 0.01$ to 0.05

compared to that of tobramycin-free biofilms (Fig. 1b). Thus, the concentration of $0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin was selected as the sub-MIC for all subsequent experiments.

Extracellular DNA release and cell biofilm death increase in presence of tobramycin

We then asked whether eDNA, a major structural component of the *P. aeruginosa* biofilm matrix,^{14,15,25} contributes to the observed enhanced biofilm formation in response to tobramycin. CLSM and COMSTAT image analyses were used to evaluate the in situ eDNA level. The bacterial cells were labeled with the green fluorescent nucleic acid stain SYTO 9, and DDAO, a red fluorescent probe unable to cross the cell membranes, was used for eDNA staining. Figure 2a shows that the red labeling is more intense in a biofilm grown for 24 h in the presence of tobramycin than in a

tobramycin-free biofilm, revealing a higher eDNA content in the first condition. Moreover, the red fluorescence was visible at the periphery of 3D structures in the presence of tobramycin, showing that eDNA might be involved, at least partly, in modifying the biofilm architecture in response to tobramycin. In the absence of tobramycin, a yellow coloration due to the superposition of the green (bacteria) and red (eDNA) fluorescence was observed, suggesting that eDNA was mostly localized within the biofilm. COMSTAT analyses indicated a 2.1-fold relative increase in eDNA abundance when biofilms were exposed to sub-MIC of tobramycin (Fig. 2b). To assess the impact of eDNA on biofilm formation, biofilms were grown with tobramycin, DNase I ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), or tobramycin and DNase I simultaneously, and were compared to untreated biofilms. The addition of DNase I at the onset of biofilm formation decreased the biovolume of 24-h-old tobramycin-free

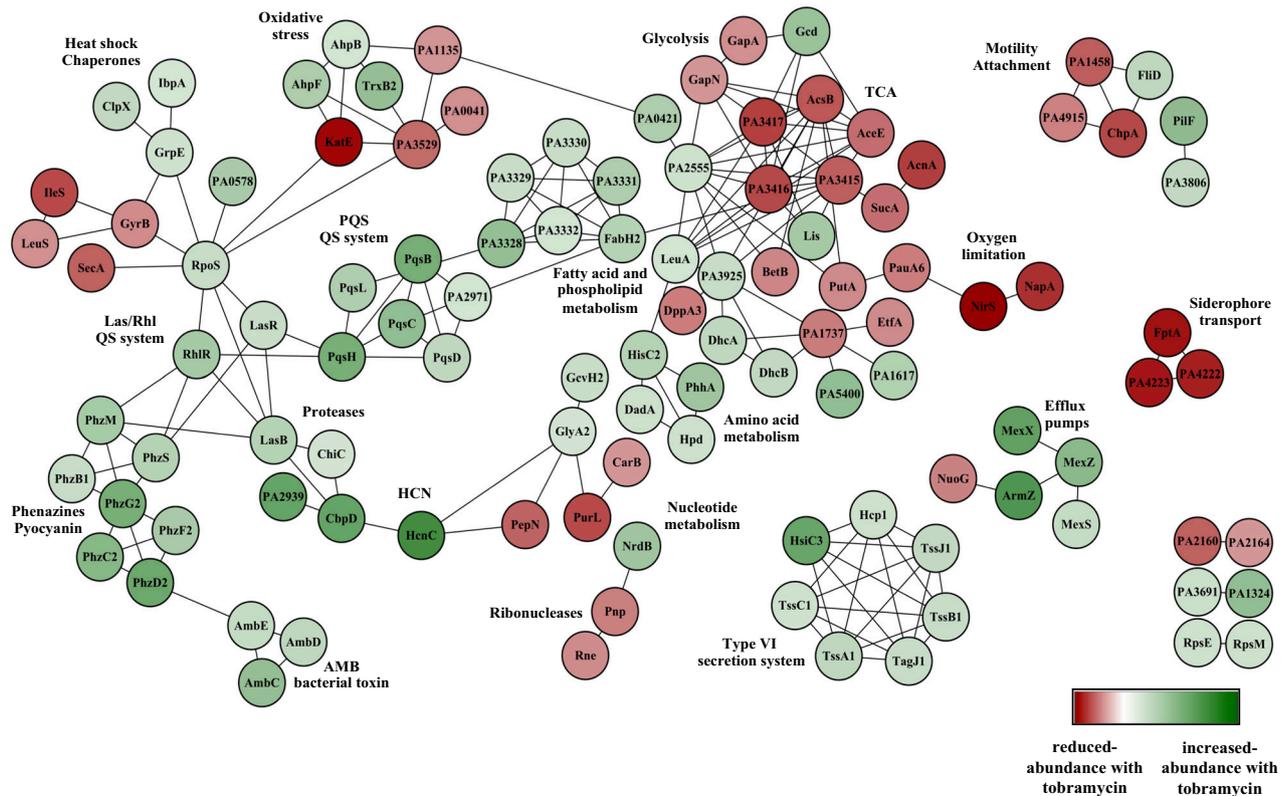


Fig. 3 Protein–protein interaction network for highly differentially accumulated proteins in the *P. aeruginosa* biofilm cultures exposed to sub-MIC level of tobramycin. Nodes are colored according to the protein abundance (fold change). Nodes highlighted in green color correspond to the overaccumulated proteins whereas the nodes in red color represent the underaccumulated proteins. Edges indicate protein–protein interactions

biofilms by 27% (Fig. 2c). Interestingly, when biofilms were formed simultaneously in presence of DNase I and tobramycin, the total biofilm biovolume was reduced by 42.4% compared to biofilm formed under tobramycin exposure without DNase I (Fig. 2c). Similarly, COMSTAT images analyses indicated that while the eDNA relative abundance in biofilms of H103 grown in the presence of DNase I was decreased by about 20.2%, it was reduced by 33.5% in biofilms grown with both DNase I and tobramycin compared to tobramycin-exposed biofilms without DNase I. These results indicate that eDNA release contributes to a certain extent to tobramycin-enhanced biofilm formation by *P. aeruginosa* H103. Moreover, we attempted to assess if the eDNA release occurs through cell lysis. To this end, cell death was evaluated using the Live/Dead staining kit (Fig. 2d). COMSTAT analyses of CLSM images revealed that cell death was significantly increased from 1 to 1.25-fold (by about 25%) in *P. aeruginosa* H103 biofilms grown in the presence of tobramycin compared to tobramycin-free biofilms (Fig. 2e). Altogether, these data indicate that tobramycin at sub-MIC induced eDNA release, most likely through cell lysis, thereby modifying the matrix composition, which might contribute at least in part to the increased biofilm formation.

Proteomic profiling of tobramycin-enhanced biofilm formation suggests a complex adaptive physiology

To gain further insights into the tobramycin-enhanced biofilm formation potential adaptive mechanisms, the whole biofilm proteome was analyzed. The obtained results allowed the identification of 174 proteins with at least a twofold change in abundance in presence of sub-MIC tobramycin. Among these, 118 proteins showed increased abundances (Supplementary Table 1) while 56 were less abundant (Supplementary Table 2). An

enrichment analysis with respect to PseudoCAP functional classes²⁶ was performed for the reduced and increased-abundance proteins, respectively (Supplementary Fig. 1). The majority of enriched PseudoCAP functions for increased-abundance proteins belong to the categories of “secreted factors”, “adaptation and protection”, “antibiotic resistance and susceptibility”, “chaperones & heat shock proteins”, “amino acid biosynthesis and metabolism”, and “biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers” (Supplementary Fig. 1). By contrast, for reduced-abundance proteins, the PseudoCAP functional classes belong to “transcription, RNA processing, and degradation”, “energy metabolism”, “amino acid biosynthesis and metabolism”, and “carbon compound catabolism” (Supplementary Fig. 1). Next, a protein–protein interaction network was determined for proteins that were differentially produced in tobramycin-exposed biofilm. One hundred and ninety-one functional connections were inferred between 111 of the 174 proteins by selecting connections over a threshold of 0.7 of confidence combined score. The resulting string network was visualized within Cytoscape (version 3.2.1)²⁷ (Fig. 3). The obtained results suggest a high number of interactions between the identified proteins which might be involved in the tobramycin-induced biofilm formation in *P. aeruginosa*. Interestingly, the proteome response to sub-MIC tobramycin treatment revealed increased levels of proteins associated with QS signaling networks, phenazine biosynthetic pathways and extracellular proteases (Supplementary Table 1; Fig. 3). On the other hand, the proteome analysis showed a decreased abundance of some proteins that are involved in central metabolism, including proteins associated with glycolysis, TCA cycle, and anaerobic metabolism (Supplementary Table 2; Fig. 3). Noticeably, the proteome of tobramycin-exposed *P. aeruginosa* biofilm showed reduced accumulation of ribonucleases RNase E

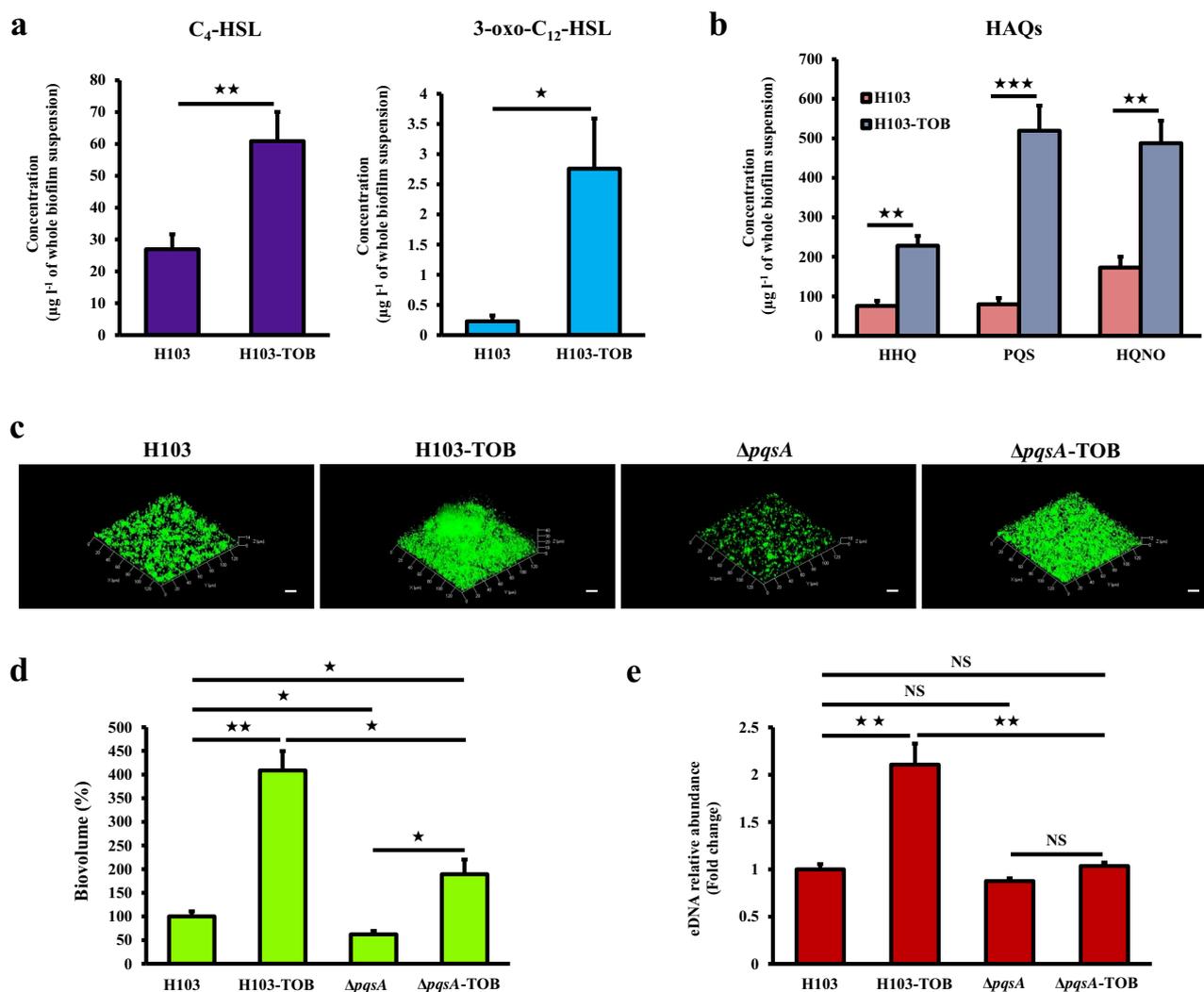


Fig. 4 Tobramycin-enhanced biofilm formation is associated with increased production of QS molecules. **a** Quantification of the two main AHLs (C₄-HSL and 3-oxo-C₁₂-HSL) of Rhl and Las QS systems by LC-MS/MS analysis. Error bars represent standard error of the means ($n \geq 3$). **b** Quantification of HAQ molecules (HHQ, PQS, and HQNO) by LC-MS/MS analysis. Error bars represent standard error of the means ($n \geq 3$). **c** Representative CLSM 3D-top micrographs of 24-h-old biofilms of *P. aeruginosa* H103 and $\Delta pqsA$ mutant strains exposed to tobramycin (0.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) compared to untreated biofilms. Scale bars = 20 μm . CLSM images were analyzed using COMSTAT software to quantify **d** biofilm biovolumes. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$) and **e** eDNA relative abundances. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). eDNA values were normalized to biofilm biovolumes. Asterisks indicate a significant difference as determined by a two-tailed *t* test: ★★★, $P = 0.0001$ to 0.001 ; **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (not significant), $P \geq 0.05$

(PA2976), RNase R (PA4937), and PNPase (PA4740) (Supplementary Table 2; Fig. 3), suggesting a possible reduced catabolism of RNAs. Overall, these proteomic data revealing alterations in the abundance of numerous proteins suggest complex adaptive mechanisms underlying tobramycin-increased biofilm development by *P. aeruginosa*.

Tobramycin-enhanced biofilm formation is associated to production of QS molecules

Since QS signaling molecules have been reported to be involved in eDNA release via subpopulation cell lysis,²⁸ the ability of tobramycin to increase the production of QS-related molecules in colony biofilms of H103 strain was determined using LC-MS/MS quantification. As shown in Fig. 4a, tobramycin significantly increased the production of the two main *P. aeruginosa* *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs), *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL), and *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL). Furthermore, the major molecules from the HAQs family,

namely 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (termed the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)), its precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxide (HQNO) were all significantly more abundant upon tobramycin exposure (Fig. 4b). Accordingly, the proteomic analyses revealed an enhanced production of PqsB (PA0997), PqsC (PA0998), and PqsD (PA0999) that are involved in HHQ biosynthesis (Supplementary Table 1; Fig. 3). This was also the case for both PqsH (PA2587), responsible for the conversion of HHQ into PQS,^{29,30} and PqsL (PA4190), which is required for HQNO biosynthesis³¹ (Supplementary Table 1; Fig. 3). These results provide evidence that sub-MIC of tobramycin induces the production of QS-related molecules, especially PQS and HQNO that might be involved in eDNA release and/or cell lysis, leading partly to the observed tobramycin-increased biofilm formation in *P. aeruginosa*. To support this hypothesis, a *pqs* mutant strain ($\Delta pqsA$) was constructed to determine the impact of HAQ molecules on biofilm formation and eDNA release in tobramycin-exposed biofilms (Fig. 4c). As expected, HAQs levels determined by LC/

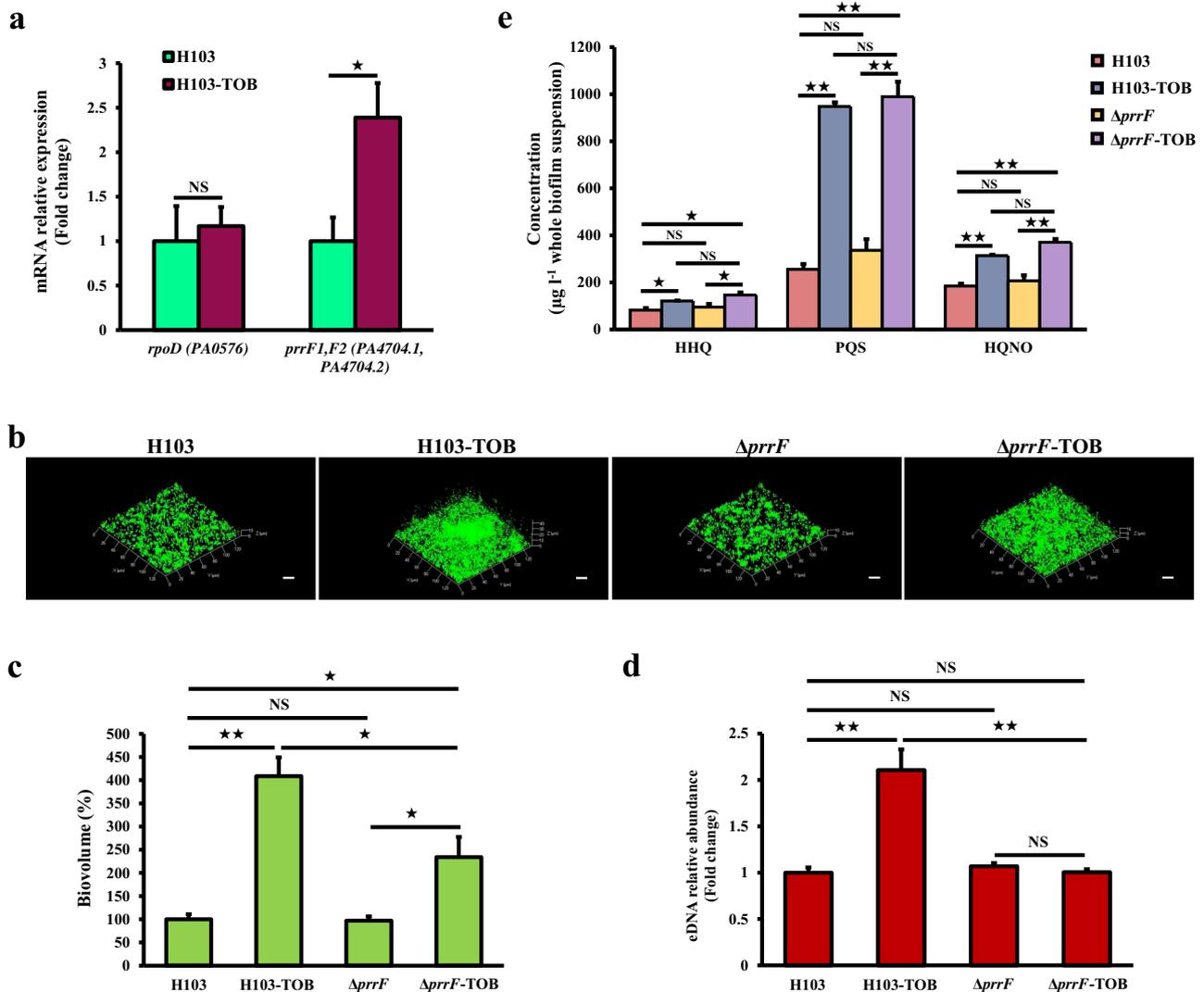


Fig. 5 Role of PrrF1/F2 sRNAs in tobramycin-enhanced biofilm formation. **a** Relative *prrF* mRNA levels in *P. aeruginosa* biofilms exposed to tobramycin (brown bars) compared to the relative expression of mRNA levels in the control condition (green bars), after 24 h of growth. Quantifications have been obtained from at least three independent experiments and *rpoD* was used as a control housekeeping gene. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). **b** Representative CLSM 3D micrographs of 24-h-old biofilms *P. aeruginosa* H103 and $\Delta prfF$ mutant strains exposed to tobramycin ($0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$) compared to untreated biofilms. Scale bars = 20 μm . CLSM images were analyzed using COMSTAT software to quantify **c** biofilm biovolumes. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$) and **d** eDNA relative abundances. eDNA values are normalized to biofilm biomass. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). **e** HAQs levels of the $\Delta prfF$ mutant and its isogenic parent strain H103 grown with or without tobramycin supplementation, as determined by LC-MS/MS. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (not significant), $P \geq 0.05$

MS-MS were shown to be abolished in $\Delta pq sA$ biofilm exposed or not to tobramycin compared to HAQs levels of H103 wild-type strain (Supplementary Table 3). The $\Delta pq sA$ mutant displayed reduced biofilm biovolume (by about 38%) compared to H103. The presence of tobramycin in $\Delta pq sA$ biofilm cultures increased the biovolume compared to $\Delta pq sA$ tobramycin-free biofilms as in the case of H103 treated or not with tobramycin but in a minor rise proportion (Fig. 4d). Noticeably, the biofilm biovolume of $\Delta pq sA$ biofilms grown in presence of sub-MIC of tobramycin was significantly reduced (53.6%) when compared to the biovolume of H103 biofilms grown in the same conditions. By contrast, the eDNA relative abundance did not increase in $\Delta pq sA$ biofilms in presence of tobramycin compared to biofilms of the same strain without tobramycin, on the opposite to the tobramycin-induced eDNA increase seen in H103 biofilms (Fig. 4e). The relative eDNA abundances were thus not significantly different in tobramycin-

free H103 biofilms and $\Delta pq sA$ biofilms with or without antibiotic, and were only higher in H103 biofilms with tobramycin (Fig. 4e). Taken together, these data indicate that whereas the biofilm biovolume enhancement could still occur in response to sub-MIC of tobramycin in $\Delta pq sA$ biofilms, at least a part of the increase of eDNA release appears to be HAQ-dependent.

PrrF sRNAs promote tobramycin-enhanced biofilm formation

A previous study reported that biofilm formation in the *prrF* mutant is not induced under sub-MIC of tobramycin.³² Thus, the effect of tobramycin was assessed on PrrF sRNAs expression using RT-qPCR. Interestingly, the expression of PrrF sRNAs was significantly increased by 2.4-fold (Fig. 5a), suggesting their involvement in the tobramycin-enhanced biofilm formation in *P. aeruginosa*. To further validate this hypothesis, biofilm formation

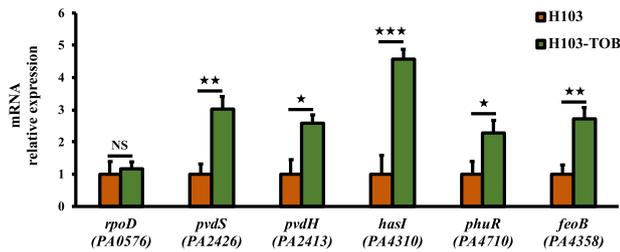


Fig. 6 Sub-MIC of tobramycin enhance iron/heme uptake strategies in *P. aeruginosa* biofilm cultures. Relative *pvdS*, *pvdH*, *hasI*, *phuR*, and *feoB* mRNA levels in *P. aeruginosa* biofilm cultures exposed to sub-MIC of tobramycin (green bars) compared to the relative mRNA levels in the control condition (brown bars), after 24 h of growth. Quantifications have been obtained from at least three independent experiments and *rpoD* was used as a control housekeeping gene. Error bars represent standard error of the means ($n = 3$). Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: ★★, $P = 0.0001$ to 0.001 ; ★★, $P = 0.001$ to 0.01 ; ★, $P = 0.01$ to 0.05

and eDNA release were evaluated in a $\Delta prrF$ mutant under tobramycin exposure (Fig. 5b). As seen in Fig. 5c, no significant difference was observed between the biofilm biovolume of *P. aeruginosa* $\Delta prrF$ mutant and H103 strains in the absence of antibiotic. Remarkably, sub-MIC of tobramycin-enhanced biofilm biovolume in $\Delta prrF$ mutant compared to $\Delta prrF$ tobramycin-free biofilm as in the case of the biofilm formation of H103 grown without or with tobramycin but in a minor rise proportion (Fig. 5c). However, tobramycin-treated biofilm of $\Delta prrF$ mutant did not show increased relative abundance of eDNA (Fig. 5d). Interestingly, HAQs quantification by LC-MS/MS showed that deletion of PrrF sRNAs had no significant effect on the production levels of HHQ, PQS, and HQNO when compared to H103 strain grown in the same conditions (Fig. 5e). Moreover, the HAQs levels in the exposed-tobramycin biofilm of $\Delta prrF$ mutant were increased to levels at those of the H103 biofilm treated with tobramycin (Fig. 5e). Altogether, these results indicate a link between PrrF sRNAs and eDNA release probably mediated through an HAQ-independent mechanism in response to sub-MIC of tobramycin.

Effect of tobramycin on iron uptake systems and oxidative stress response in biofilm

The PrrF1 and PrrF2 sRNAs are key elements of *P. aeruginosa* iron homeostasis³² and previous studies demonstrated the requirement of iron for induction of biofilm formation in *P. aeruginosa* by sub-MIC of tobramycin.³³ Therefore, the effect of tobramycin was explored on the expression of iron and heme acquisition systems. RT-qPCR analyses indicated increased expression of *pvdS* encoding the PvdS extracytoplasmic function sigma factor (ECF σ)³⁴ and the *pvdH* biosynthetic gene by about threefold in response to tobramycin (Fig. 6). Similarly, expression of *hasI* and *phuR*, encoding the HasI ECF σ for the Has-dependent heme uptake system and heme/hemoglobin outer membrane receptor PhuR increased in the presence of tobramycin, reflecting the activity of the heme acquisition (Has) and the heme uptake (Phu) systems (Fig. 6). Finally, we assayed the Feo system for the uptake of Fe²⁺ and showed enhanced expression of *feoB* encoding the inner membrane permease FeoB (Fig. 6). The enhancement of these iron uptake systems in response to tobramycin reveals a high demand of iron that might lead to oxidative damages. Interestingly, proteomic data analysis showed that the two alkyl hydroperoxide reductases AhpF (PA0140) and AhpB (PA0848) were significantly more abundant in tobramycin-exposed biofilm. Additionally, the protein TrxB (PA0849), a thioredoxin reductase, which protects protein disulfide bonds from oxidation was also induced (Supplementary Table 1; Fig. 3). Collectively, these data suggest a contribution of iron and oxidative stress responses into the

tobramycin-enhanced biofilm formation in *P. aeruginosa* that could be mediated by the PrrF sRNAs.

DISCUSSION

Bacteria have the ability to adapt to numerous environmental stresses by setting up different biological responses such as the enhancement of biofilm formation, notably upon exposure to low antibiotic concentrations.^{12,13} Through CLSM observations, whole biofilm proteome analysis, gene expression RT-qPCR assays, and phenotypic approaches, we present herein further insights into the adaptation mechanisms leading to increased biofilm formation in *P. aeruginosa* in response to sub-MIC of tobramycin. The effect of sub-MIC of tobramycin on increased biofilm development in *P. aeruginosa* was corroborated^{19–21} and the present work demonstrates modifications in the biofilm architecture. Remarkably, tobramycin exposure results in biofilm matrix modifications by increasing eDNA abundance levels, which in turn favors the built up of 3D structures¹⁵ leading to elevated biofilm biovolume and thickness, as confirmed by DNase I treatment. This result mirrors those of previous studies that have shown increased matricial extracellular nucleic acids amounts in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* in response to sub-MICs of ampicillin and methicillin, respectively.^{35,36}

eDNA was previously described to play a structural role in biofilm formation, to bind and shield biofilms from aminoglycosides, and to induce antimicrobial peptide resistance mechanisms in *P. aeruginosa*.^{37–40} The observed rise in eDNA release is presumably a consequence of elevated cell biofilm death that seems to be mediated by a QS-dependent mechanism. Accordingly, data of the current study demonstrate increased production levels of HAQ molecules (HHQ, PQS, and HQNO) in *P. aeruginosa* H103 strain and decreased eDNA release in $\Delta pqsA$ in response to sub-MIC of tobramycin. This finding is in agreement with a previous study which showed that HAQs play a key role in eDNA release, occurring as a result of biofilm subpopulations lysis.²⁸ However, given that $\Delta pqsA$ biofilm biovolume decreased, we have been unable to show differences in terms of eDNA release between *pqsA* mutant and H103 strains in the absence of tobramycin. This result was unexpected and suggests that an alternative potential eDNA-independent mechanism might be involved. Besides, HQNO is a well-known molecule that can act as a cytochrome inhibitor of the respiratory chain,⁴¹ inducing thus the production of reactive oxygen species (ROS), which are involved in membrane damages resulting in cell autolysis and eDNA release.⁴² We found here also that proteins related to phenazine biosynthesis and several extracellular proteases triggered through the QS system are enhanced in presence of sub-MIC tobramycin. Previous findings demonstrated that pyocyanin enhances the matrix stability by interacting with eDNA, thus enabling the strength and development of the biofilm.^{43,44} Moreover, the current study demonstrated significant higher production levels of the two AHL signal molecules, 3-oxo-C₁₂-HSL and C₄-HSL, produced by the Las and Rhl QS systems, respectively, that are involved in *P. aeruginosa* biofilm development.^{13,45} The induction of the Las system under tobramycin exposure may trigger the observed increased accumulation of proteins related to HAQ biosynthesis. Altogether these data suggest a key role for the HAQ, including in signaling, and probably also ROS in the release of eDNA leading to increased biofilm development in response to sub-MIC of tobramycin.

Previous studies reported that PQS triggers iron-starvation response in *P. aeruginosa* by its ability to chelate ferric iron (Fe³⁺) and functions as an iron trap associated with the outer membrane.^{46,47} In fact, several iron acquisition systems are overexpressed in *P. aeruginosa* biofilm under tobramycin exposure. This study demonstrates higher expression levels of genes involved in the biosynthesis of pyoverdine siderophore, which is

of importance for biofilm formation.^{48,49} The two heme uptake systems Has and Phu and the ferrous iron uptake Feo system are also increased. Remarkably, phenazine-1-carboxylic acid, that can reduce ferric iron to its ferrous oxidation state, promotes biofilm formation through the Feo system.⁵⁰ Thus, these results reveal a contribution of iron uptake strategies in tobramycin-enhanced biofilm formation in *P. aeruginosa*. These findings are in line with a previous study that demonstrated the role of iron in the induction of biofilm formation in *P. aeruginosa* by sub-MIC of tobramycin.³³ While the potential of iron to stimulate oxidative stress, the proteomic data of this study showed a rise of the AhpF, AhpB-TrxB2 proteins responsible for an antioxidant mechanism activity⁵¹ that would help limiting some adverse effects of ROS. In addition, the PqsR (MvfR) transcriptional regulator activated by PQS modulates the expression of genes involved in the oxidative stress response.⁵¹

Besides, the iron-starvation response revealed by gene expression data seems to be involved in the increased expression of regulatory PrrF sRNAs that are known to regulate several genes involved in protection from oxidative stress and iron storage.^{32,52} Remarkably, an important finding of this study was that biofilms formed by $\Delta prrF$ in presence of tobramycin contain less eDNA than H103 strain biofilm formed under the same condition, therefore following a similar trend as the $\Delta pqsA$ mutant when compared to *P. aeruginosa* H103 strain under tobramycin exposure. However, while PrrF sRNAs were shown previously to modulate HAQs production under planktonic conditions,^{53,54} our study that was conducted in biofilms showed that $\Delta prrF$ mutant produced HAQs levels similar to those of the wild-type strain grown with or without tobramycin. These data suggest that HAQs production modulation by PrrF sRNAs might not play an important role in H103 strain and studied conditions and point out to the complex regulation of HAQs production. In summary, these data suggest that regulatory PrrF sRNAs are key players mediating eDNA release through possibly another potential HAQ-independent mechanism leading to tobramycin-increased biofilm formation. Furthermore, the whole proteome data show decreased abundances of RNases including RNaseE, RNaseR, and PNPase in the presence of sub-MIC of tobramycin that appears to explain the increased expression of sRNAs. Recent studies indicate that RNases greatly affect biofilm formation by causing sRNAs decay in microorganisms such as *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*.^{55–57}

In addition, numerous metabolic pathways were affected in the whole biofilm proteome exposed to tobramycin. Especially, proteins related to glycolysis, TCA, and denitrification pathways were under-produced, suggesting a metabolic adaptation under biofilm growth in the presence of tobramycin. Interestingly, a recent study reported the functional enrichment of proteins related to TCA, carbon metabolism and energy derivation, and electron transport activities, which were under-accumulated in the presence of tobramycin under planktonic conditions.²⁴ *P. aeruginosa* was demonstrated to use PQS to downregulate genes involved in denitrification in planktonic conditions,⁵⁸ indicating a link between QS and energy metabolism. Recently, AHL-mediated QS was shown to alter TCA cycle intermediates, and fatty acid and amino acid metabolism during stationary phase.⁵⁹ Amino acid metabolism (as carnitine and lysine) was also affected upon tobramycin exposure in our study according to previous data observed when *P. aeruginosa* was grown in planktonic conditions.²⁴ Moreover, and in line with our results, the enhanced catabolism of the amino acids arginine, phenylalanine and tyrosine was reported.⁶⁰

Overall, we suggest herein new potential adaptive mechanisms on how sublethal concentrations of tobramycin lead to increased biofilm formation in *P. aeruginosa*. Importantly, the release of eDNA might explain, at least in part, the enhancement of biofilm formation and point to the fundamental role of the biofilm matrix.

HAQs and regulatory PrrF sRNAs appears to be key players in the eDNA release since no effect of tobramycin was observed on eDNA release in $\Delta pqsA$ and $\Delta prrF$ mutants. However, there was still an impact of tobramycin on $\Delta pqsA$ and $\Delta prrF$ biofilm formation suggesting that alternative mechanism(s) may possibly be involved. In addition, it is apparent that the decreased eDNA release observed in $\Delta pqsA$ and $\Delta prrF$ mutants occur through distinct mechanisms and we cannot disregard the importance of the other discussed adaptive mechanisms which deserve further investigations.

METHODS

Bacterial strains, growth conditions and antibiotics

The *P. aeruginosa* H103 strain and derivatives are listed in Supplementary Table 4. *P. aeruginosa* H103 biofilms were grown on membrane filters (25 mm diameter, 0.2 μm pore size, Whatman) placed over the surface of freshly prepared LB agar plates supplemented or not with the required concentration of tobramycin (Sigma-Aldrich). To this end, overnight planktonic cultures grown aerobically at 37 °C in LB broth on a rotary shaker (180 r.p.m.) were diluted to an OD at 580 nm of 1 and 100 μl spotted on the membrane. The bacteria were incubated at 37 °C for 24 h on static conditions. The antibiotics stock solutions used in this study were sterilized by filtration through 0.22- μm filters, aliquoted into daily-use volumes and kept at –20 °C.

Sensitivity of *P. aeruginosa* to tobramycin

ETEST[®] tobramycin gradient strip (0.016–256 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Biomérieux) was used to assess the MIC assay for *P. aeruginosa* strain H103 according to the manufacturer's instructions. An inoculum containing a concentration of bacteria that approximates the 0.5 McFarland turbidity standard was used. Antibiotic sensitivity was read after 24 h incubation at 37 °C.

Construction of the $\Delta pqsA$ and $\Delta prrF$ mutant strains

The *pqsA* and *prrF* mutant strains were constructed by following the procedure described by Qu  e et al.⁶¹ Briefly, the *pqsA* and *prrF*-flanking regions were PCR amplified using the primer pairs listed in Supplementary Table 5. PCR products *pqsA*- or *prrF*-upstream and *pqsA*- or *prrF*-downstream were digested by *SacI/XbaI* or *EcoRI/XbaI* and *XbaI/HindIII*, respectively, and cloned by a three-way ligation into the suicide vector pEX100Tlink opened by *SacI* and *HindIII* or *EcoRI* and *HindIII*. These cloning strategies resulted in the construction of pEX: $\Delta pqsA$ and pEX: $\Delta prrF$ plasmids, respectively. The *lox-aacC1-lox* cassette encoding gentamicin (Gm) resistance was excised from pUCGmlox⁶¹ using *XbaI* and was subcloned into the unique *XbaI* site of pEX: $\Delta pqsA$ and pEX: $\Delta prrF$. The resulting pEX: $\Delta pqsA$:Gmlox and pEX: $\Delta prrF$:Gmlox plasmids were then introduced into the *E. coli* donor/helper strain S17.1 and transferred by conjugation into *P. aeruginosa* H103. Gm-resistant colonies grown on Pseudomonas isolation agar (PIA) plates were counter-selected on 5% sucrose LB agar plates, and the double recombinants were selected for their Gm resistance and carbenicillin (Cb) sensitivity. Finally, the *aacC1* gene conferring Gm resistance was excised by the Cre recombinase encoded by pCM157.⁶² The resulting $\Delta pqsA$ and $\Delta prrF$ mutant strains were checked by PCR using primer pairs *pqsA-SacI-F/pqsA-HindIII-R* and *prrF-EcoRI-F/prrF-HindIII-R*, respectively (Supplementary Table 5), and the resulting fragments were verified by DNA sequencing (Sanger sequencing services, Genewiz).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

P. aeruginosa H103, $\Delta pqsA$, and $\Delta prrF$ biofilms were grown in LB medium supplemented or not with the required concentration of tobramycin on a 24-well glass-bottomed microplates for 24 h at 37 °C in static conditions. Biofilm formation in the presence of DNase I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich) was performed by supplementing LB medium with DNase I at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.⁶³ Prior to image acquisition, biofilm cells and eDNA matrix component were stained with fluorescent dyes and observed by CLSM. Biofilm cells were stained by adding 5 μM of SYTO[®] 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; excitation at 488 nm and emission from 500 to 550 nm) or 5 μM of SYTO[®] 62 red fluorescent nucleic acid stain (Molecular Probes, Life Technologies; excitation at 652 nm and emission at 676 nm) prepared in sterile physiological solution

(0.9% NaCl), incubated at room temperature for 15 min in the dark and then washed twice with sterile physiological solution (0.9% NaCl).

The eDNA biofilm-component matrix was stained using 1 μM of 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (DDAO), a red fluorescent probe (Molecular Probes, *life*; excitation at 663 nm and emission at 660 nm).

The Live/Dead fluorescent staining was performed using the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific). The cells were labeled with a mixture (v/v) of component A (SYTO 9 dye, 1.67 mM/propidium iodide, 1.67 mM) and component B (SYTO 9 dye, 1.67 mM/propidium iodide, 18.3 mM) according to the manufacturer's recommendations.

The CLSM observations were carried out with a Zeiss LSM710 microscope (Carl Zeiss Microscopy) using a $\times 63$ oil immersion objective. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of 3D images, the Zen 2.1 SP1 zen software (<https://www.zeiss.com/microscopy/int/downloads/zen.html>) (Carl Zeiss Microscopy) was used. The thicknesses (μm) and biovolumes (μm^3) of the biofilms were measured using the COMSTAT2 software (<http://www.imageanalysis.dk/>).⁶⁴ At least three image stacks from each of three independent experiments were used for each analysis.

Reverse transcription-quantitative PCR analysis (RT-qPCR)

Total RNAs from three independent biofilm cultures were isolated by the hot acid-phenol method,⁶⁵ followed by treatment with Turbo DNA-free[™] kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Synthesis of cDNAs and RT-qPCR was achieved as previously described,⁶⁶ using the oligonucleotides listed in Supplementary Table 3. The mRNAs and sRNAs levels were calculated by comparing the threshold cycles (Ct) of target genes with those of control sample groups and the relative quantification was measured using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method⁶⁷ using DataAssist[™] software (Applied Biosystems).

LITQ-orbitrap analysis

The sample preparation, protein digestion, tandem mass spectrometry and whole proteome analysis was performed as previously described.⁶⁸ All experiments were performed on an LITQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) coupled to an Easy nLC II system (Thermo Scientific). One microliter of sample was injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific). The separation was performed with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos, Japan). The mobile phase consisted of $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ formic acid (FA) (buffer A) and $\text{CH}_3\text{CN}/\text{FA}$ 0.1% (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nl/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 min and 11 min at 80% B. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275 $^\circ\text{C}$, respectively. The samples were analyzed using CID (collision induced dissociation) method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer ($R = 60,000$) with the mass range m/z 400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS² experiments. Singly charged species were excluded for MS² experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s, with a repeat count of 1, a repeat duration of 30 s and an exclusion mass width of ± 10 ppm. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with collision energy of 35%. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclosiloxane). After MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. Peptide features presenting a p value and a q value less than 0.05, and a power greater than 0.8 were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science) against the database restricted to *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>).²⁶ Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage site allowed; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. Peptides with scores above 20 were imported into Progenesis. For each condition, the total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of peptides. Proteins identified with less than two peptides were discarded. Only the proteins that varied by twofold in these average normalized abundances between

growth conditions were retained. Expression data for all significantly differentially produced proteins are available in Supplementary Tables 1 and 2.

Functional enrichment of proteomic data

The enrichment factor (EF) was calculated using the following formula: $\text{EF} = (\text{number of specific PseudoCAP classes detected} / \text{number of all PseudoCAP classes detected}) / (\text{number of specific PseudoCAP classes annotated} / \text{number of all PseudoCAP classes annotated})$. Functional categories displaying an $\text{EF} \geq 1.5$ are defined as overrepresented in the functional proteomic profiling of the tobramycin-exposed biofilm (Supplementary Fig. 1).

P. aeruginosa whole biofilm Protein–Protein Interaction Network (PPIN) inference

P. aeruginosa PAO1 Protein–Protein Interaction Network (PPIN) was retrieved from the STRING database (<http://string-db.org/>).⁶⁹ One hundred and ninety-one functional connections were inferred between 111 proteins of the 174 proteins by selecting connections over a threshold of 0.7 of confidence combined score. The 63 proteins without any connection to other proteins in the network were removed. The resulting string network was visualized within Cytoscape (version 3.2.1) (<http://www.cytoscape.org>).²⁷

Extraction and quantification of AHLs and HAQs

Colony biofilms of H103 strain and its derivative mutants exposed or not to tobramycin were resuspended in 0.9% NaCl (three-colony biofilms per 10 ml of 0.9% NaCl). Biofilm suspensions were vortexed for 2 min and the AHL and HAQ molecules were extracted following the technique described in a previous study.⁷⁰ AHLs and HAQs were quantified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS).^{29,71} The obtained data were normalized to OD of biofilm suspensions. AHL standards were obtained from Sigma [N-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) and N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL)].

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using Prism GraphPad online tool (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). The data were statistically analyzed using unpaired (two sample) two-tailed t test to calculate p values. The mean with standard error of the mean (SEM) were calculated and plotted.

Reporting summary

Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this paper.

DATA AVAILABILITY

The authors declare that all relevant data supporting the findings of the study are available in this article and its Supplementary Information files, or from the corresponding author upon request.

ACKNOWLEDGEMENTS

The LMSM is supported by the Région Normandie (France), Evreux Portes de Normandie (France), European FEDER funds and the French Association "Vaincre la Mucoviscidose". A.T. is supported by a post-doctoral fellowship from European Union (FEDER) and Région Normandie (France). D.T. and R.D. were supported by doctoral fellowships from the Région Normandie (France). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit this work for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.T., S.C., E.B., and O.L. designed the experiments. A.T., R.D., E.B., S.R., J.H., O.M., D.T., L.T., and M.-C.G. conducted experiments and analyzed the data. A.T., S.C., P.C., E.B., A.D., E.D., G.B.-W., M.F., and N.O. contributed to the writing of the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information accompanies the paper on the *npj Biofilms and Microbiomes* website (<https://doi.org/10.1038/s41522-019-0088-3>).

Competing interests: The authors declare no competing interests.

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

REFERENCES

- López, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a00398 (2010).
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
- Flemming, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016).
- Ciofu, O., Rojo-Moliner, E., Macià, M. D. & Oliver, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS* **125**, 304–319 (2017).
- Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 737–751 (2011).
- Tolker-Nielsen, T. Biofilm development. *Microbiol. Spectr.* **3**, MB-0001–MB-2014 (2015).
- Chevalier, S. et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 698–722 (2017).
- Lesouhaitier, O. et al. Host peptidic hormones affecting bacterial biofilm formation and virulence. *J. Innate Immun.* **5**, 1–15 (2018).
- Davies, J., Spiegelman, G. B. & Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 445–453 (2006).
- Fajardo, A. & Martínez, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 161–167 (2008).
- Song, T., Dupertuy, M. & Wai, S. Sub-optimal treatment of bacterial biofilms. *Antibiotics* **5**, 23 (2016).
- Andersson, D. I. & Hughes, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 465–478 (2014).
- 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).
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
- Mann, E. E. & Wozniak, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 893–916 (2012).
- Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159–173 (2013).
- Sousa, A. & Pereira, M. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—a review. *Pathogens* **3**, 680–703 (2014).
- Cheer, S. M., Waugh, J. & Noble, S. Inhaled tobramycin (TOBI®): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis. *Drugs* **63**, 2501–2520 (2003).
- Hoffman, L. R. et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171–1175 (2005).
- Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H. & Filloux, A. Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. *PLoS ONE* **8**, e81132 (2013).
- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F. & Martínez, J. L. Antibiotics as inter-microbial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 19484–19489 (2006).
- Elliott, D., Burns, J. L. & Hoffman, L. R. Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3024–3026 (2010).
- Gotoh, H. et al. *Pseudomonas aeruginosa*, under DNA replication inhibition, tends to form biofilms via Arr. *Res. Microbiol.* **159**, 294–302 (2008).
- Wu, X. et al. Dynamic proteome response of *Pseudomonas aeruginosa* to tobramycin antibiotic treatment. *Mol. Cell. Proteom.* **14**, 2126–2137 (2015).
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487 (2002).
- Winsor, G. L. et al. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646–D653 (2016).
- Shannon, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
- Allesen-Holm, M. et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114–1128 (2006).
- Déziel, E. et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1339–1344 (2004).
- Schertzer, J. W., Brown, S. A. & Whiteley, M. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol. Microbiol.* **77**, 1527–1538 (2010).
- Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J. & Rahme, L. G. Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 862–869 (2004).
- Reinhart, A. A. et al. The prfF-encoded small regulatory RNAs are required for iron homeostasis and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **83**, 863–875 (2015).
- Oglesby-Sherrouse, A. G., Djapgne, L., Nguyen, A. T., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog. Dis.* **70**, 307–320 (2014).
- Chevalier, S. et al. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta—Gene Regul. Mech.* **17**, 30313–30319 (2018).
- Kaplan, J. B. et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* **3**, e00198–12 (2012).
- Yu, W., Hallinen, K. M. & Wood, K. B. Interplay between antibiotic efficacy and drug-induced lysis underlies enhanced biofilm formation at subinhibitory drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01603–e01617 (2018).
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. & Lewenza, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* **4**, e1000213 (2008).
- Lewenza, S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **4**, 21 (2013).
- Chiang, W.-C. et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2352–2361 (2013).
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R. & Lewenza, S. Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 544–553 (2016).
- Voggu, L. et al. Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **188**, 8079–8086 (2006).
- Hazan, R. et al. Auto poisoning of the respiratory chain by a quorum-sensing-regulated molecule favors biofilm formation and antibiotic tolerance. *Curr. Biol.* **26**, 195–206 (2016).
- Das, T. & Manefield, M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **7**, e46718 (2012).
- Das, T., Sehar, S. & Manefield, M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 778–786 (2013).
- Williams, P. & Cámara, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 182–191 (2009).
- Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J. & Häussler, S. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ. Microbiol.* **8**, 1318–1329 (2006).
- Diggle, S. P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem. Biol.* **14**, 87–96 (2007).
- Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomaterials* **22**, 15–22 (2009).
- Cornelis, P. & Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 75 (2013).
- Wang, Y. et al. Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J. Bacteriol.* **193**, 3606–3617 (2011).
- Maura, D., Hazan, R., Kitao, T., Ballok, A. E. & Rahme, L. G. Evidence for direct control of virulence and defense gene circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator, MvfR. *Sci. Rep.* **6**, 34083 (2016).
- Reinhart, A. A. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PrrF small RNAs regulate iron homeostasis during acute murine lung infection. *Infect. Immun.* **85**, e00764–16 (2017).
- Djapgne, L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PrrF1 and PrrF2 small regulatory RNAs (sRNAs) promote 2-alkyl-4-quinolone production through redundant regulation of the *antR* mRNA. *J. Bacteriol.* **200**, e00704–e00717 (2018).
- Oglesby, A. G. et al. The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: A regulatory link between iron and quorum sensing. *J. Biol. Chem.* **283**, 15558–15567 (2008).
- Barria, C., Vania, P., Bravo, A. M. & Cecilia, M. A. Ribonucleases as modulators of bacterial stress response. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* 1st edn, (ed. de Bruijn, F. J.) Vol. 1. (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2016).

56. Saramago, M. et al. The role of RNases in the regulation of small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**, 105–115 (2014).
57. Pobre, V. & Arraiano, C. M. Next generation sequencing analysis reveals that the ribonucleases RNase II, RNase R and PNPase affect bacterial motility and biofilm formation in *E. coli*. *BMC Genom.* **16**, 72 (2015).
58. Rampioni, G. et al. Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **12**, e1006029 (2016).
59. Davenport, P. W., Griffin, J. L. & Welch, M. Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **197**, 2072–2082 (2015).
60. Bernier, S. P., Ha, D.-G., Khan, W., Merritt, J. H. & O'Toole, G. A. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. Microbiol.* **162**, 680–688 (2011).
61. Quénée, L., Lamotte, D. & Polack, B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**, 63–67 (2005).
62. Marx, C. J. & Lidstrom, M. E. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in Gram-negative bacteria. *BioTechniques* **33**, 1062–1067 (2002).
63. Tetz, V. V. & Tetz, G. V. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol.* **8**, 399–405 (2010).
64. Heydorn, A. et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395–2407 (2000).
65. Bouffartigues, E. et al. Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the *sigX* sigma factor and is sucrose induced. *J. Bacteriol.* **194**, 4301–4311 (2012).
66. Bouffartigues, E. et al. The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front. Microbiol.* **6**, 630 (2015).
67. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
68. Clamens, T. et al. The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Sci. Rep.* **7**, 41178 (2017).
69. Szklarczyk, D. et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).
70. Tahrioui, A., Quesada, E. & Llamas, I. The *hanR/hanI* quorum-sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology* **157**, 3378–3387 (2011).
71. Bazire, A. et al. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 125–131 (2005).



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

© The Author(s) 2019

III. Annexe 3. Membrane-Interactive Compounds from *Pistacia lentiscus* L. Thwart *Pseudomonas* *aeruginosa* Virulence

J'ai contribué à cet article en réalisant une partie des expériences de cytotoxicité sur cellules A549, et par la relecture du manuscrit.

1 **Membrane-Interactive Compounds from *Pistacia lentiscus* L.**
2 **Thwart *Pseudomonas aeruginosa* Virulence**
3

4 **Ali Tahrioui^{#,1}, Sergio Ortiz², Onyedikachi Cecil Azuama¹, Emeline Bouffartigues¹,**
5 **Nabiha Benalia², Damien Tortuel¹, Olivier Maillot¹, Smain Chemat³, Marina Kritsanida²,**
6 **Marc Feuilloley¹, Nicole Orange¹, Sylvie Michel², Olivier Lesouhaitier¹, Pierre Cornelis¹,**
7 **Raphaël Grougnet², Sabrina Boutefnouchet² & Sylvie Chevalier¹**

8
9
10 ¹Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Laboratoire de Microbiologie
11 Signaux et Microenvironnement, LMSM EA4312, Évreux, France

12 ²Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Équipe
13 Produits Naturels, Analyses et Synthèses (PNAS), CiTCoM UMR 8038 CNRS, Paris, France

14 ³Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques, CRAPC,
15 Bou Ismaïl, Algérie

16
17
18 #Corresponding author:

19 Dr. Ali Tahrioui

20 Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment–LMSM EA4312, University of
21 Rouen Normandy–Normandy University, 55 Rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France

22 E-mail: ali.tahrioui@univ-rouen.fr

23 Phone: (+33) 2.32.29.15.60

24 Fax: (+33) 2.32.29.15.50

25
26 Running Title: *Pistacia lentiscus* L. fruit prevents *Pseudomonas aeruginosa* virulence

27 Keywords: *Pistacia lentiscus*, Fruit-derived extract, Ginkgolic acids, Anti-virulence,
28 *Pseudomonas aeruginosa*, Membrane stiffness, ECF σ SigX
29

30 **ABSTRACT**

31 *Pseudomonas aeruginosa* is capable to deploy a collection of virulence factors that are not
32 only essential for host infection and persistence, but also to escape from the host immune
33 system and to become more resistant to drug therapies. Thus, developing anti-virulence agents
34 that may directly counteract with specific virulence factors or disturb higher regulatory
35 pathways controlling the production of virulence armories are urgently needed. In this regard,
36 this study reports that *Pistacia lentiscus* L. fruit cyclohexane extract (PLFE1) thwarts *P.*
37 *aeruginosa* virulence by targeting mainly the pyocyanin pigment production by interfering with
38 4-hydroxy-2-alkylquinolines molecules production. Importantly, the anti-virulence activity of
39 PLFE1 appears to be associated with membrane homeostasis alteration through the
40 modulation of SigX, an extracytoplasmic function sigma factor involved in cell wall stress
41 response. A thorough chemical analysis of PLFE1 allowed us to identify the ginkgolic acid
42 (C17:1) and hydroginkgolic acid (C15:0) as the main bioactive membrane-interactive
43 compounds responsible for the observed increased membrane stiffness and anti-virulence
44 activity against *P. aeruginosa*. This study delivers a promising perspective for the potential
45 future use of PLFE1 or ginkgolic acid molecules as an adjuvant therapy to fight against *P.*
46 *aeruginosa* infections.

47

48 INTRODUCTION

49 Bacterial infections still constitute a serious public health threat even though their prevention
50 and treatment have been improved over the last decades. The effects of common antibiotics
51 are no longer effective against microbial threats including *Enterococcus faecium*,
52 *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and
53 *Enterobacter* species, also known as the “ESKAPE” pathogens group.¹ In a recent report
54 published by the World Health Organization (WHO), *P. aeruginosa* was categorized as one of
55 the “critical priority pathogens” for which there is an urgent need for the discovery of alternative
56 and innovative new therapies.²

57

58 *P. aeruginosa* is predominantly responsible for different life-threatening infections in humans,
59 including the respiratory system, burn and wound, urinary tract as well as medical implant
60 devices.³ This notorious multidrug resistant opportunistic Gram-negative bacterium deploys a
61 wide variety of virulence factors and host-degrading enzymes as well as multiple secondary
62 metabolites.⁴ Pyocyanin is an important virulence factor produced and secreted abundantly by
63 nearly 95% of *P. aeruginosa* isolates.⁵ This phenazine-derived pigment, blue-green in color,
64 confers a greenish hue to the sputum of cystic fibrosis (CF) individuals suffering *P. aeruginosa*
65 chronic lung infection.⁶ Moreover, pyocyanin is a highly diffusible redox-active secondary
66 metabolite which plays an important role in several physiological processes^{6,7} making it a good
67 target. Therefore, pyocyanin production hindrance may have consequences regarding the
68 cytotoxic effects and the full virulence of *P. aeruginosa* during infections related to airways in
69 CF.

70

71 The sophisticated quorum sensing (QS) circuitry in *P. aeruginosa* strongly controls the
72 biosynthesis of pyocyanin. This process starts with the synthesis of the *N*-acyl-L-homoserine
73 lactone (AHL) type signal molecules followed by the *Pseudomonas* quinolone signaling (PQS).
74 Next, PQS regulates the expression of *phzA-G* operons resulting in the production of
75 phenazine-1-carboxylic acid (PCA) which is then modified to produce predominantly pyocyanin
76 *via* the action of the enzymes encoded by *phzM* and *phzS*.⁸ In addition, pyocyanin biosynthesis
77 and regulation have been also linked to SigX, an extracytoplasmic function sigma factor
78 (ECF σ) that plays an essential role in the cell wall stress response network.^{9–12} In *P.*
79 *aeruginosa*, the ECF σ SigX is a global regulator that modulates the expression of more than
80 300 genes, including several genes involved in pyocyanin biosynthetic pathways.^{9,11,13} More
81 importantly, SigX has been reported to be involved in the regulation of fatty acid biosynthesis,
82 which triggers changes in cell membrane phospholipid composition that affect membrane
83 fluidity and envelope integrity.^{11,14–16} SigX is also involved in physiological processes as
84 important as iron uptake, virulence, motility, attachment, biofilm formation, and antibiotic
85 resistance and susceptibility *via* direct and/or indirect governance.^{9–11,17}

86

87 In view of this, developing anti-virulence agents that may precisely hinder the production,
88 secretion, or function of virulence determinants or interfere with their regulation has emerged
89 as an alternative promising strategy to fight against bacterial pathogens.^{18,19} Plants have long
90 been used in traditional medicine to prevent or treat infectious diseases in many countries.²⁰
91 Hydrophilic and lipophilic extracts from plants were reported to contain abundant and diverse
92 range of bioactive compounds with anti-virulence properties.^{19,21,22} *Pistacia lentiscus* L., a plant
93 commonly known as mastic tree or lentisc, is an evergreen shrub of the family of
94 *Anacardiaceae* widespread all around the Mediterranean area where it grows wild in a variety
95 of ecosystems.^{23,24} Medicinal uses of the fruit, galls, resin, and leaves of *P. lentiscus* L. are

96 described since antiquity. However, they may differ either in the therapeutic indication or in the
97 plant part used for medicinal purpose, depending of the geographical area.^{25,26}

98

99 Currently, there are no research, which have explored the anti-virulence potential of *P.*
100 *lentiscus* L. fruit, or the molecular mechanism of action, which underpins its major bioactive
101 compounds against *P. aeruginosa*. Herein, we report that *P. lentiscus* L. fruit cyclohexane
102 extract (PLFE1) can function as a potent pyocyanin inhibitor while being devoid of any
103 antibacterial activity as judged by cell growth and viability assays. We show that PLFE1
104 interferes with 4-hydroxy-2-alkylquinolines molecules production, which might explain its anti-
105 pyocyanin activity. We also demonstrate that PLFE1 is able to increase significantly membrane
106 stiffness in *P. aeruginosa*. Interestingly, the cell wall stress response ECF σ SigX is found to be
107 a key regulatory element in this phenomenon, which might respond to the presence of
108 envelope-interactive compounds in PLFE1. Furthermore, comprehensive chemical analyses of
109 PLFE1 and its derived fractions allowed us to identify the ginkgolic acid (C17:1) and
110 hydroginkgolic acid (C15:0) as the major bioactive compounds and we confirmed that they are
111 responsible of the main anti-virulence activity against the pathogen *P. aeruginosa*.

112

113 **RESULTS**

114 **Pyocyanin production inhibition by *P. lentiscus* L. fruit extracts**

115 Planktonic cultures of wild-type *P. aeruginosa* H103 were exposed to cyclohexane, ethyl
116 acetate, methanol, and water *P. lentiscus* L. fruit extracts at concentrations of 100, 50, 25, 12.5,
117 6.25, 3.12, 1.6 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and assayed for interference with pyocyanin production (Fig.
118 1A). Pyocyanin levels from H103 strain cultures untreated with *P. lentiscus* L. fruit extracts and
119 treated with 1% v/v DMSO were also measured as negative control and defined as 100%

120 pyocyanin production. The PLFE1 (cyclohexane extract) showed statistically significant
121 inhibition of pyocyanin biosynthesis at the all concentration tested. The PLFE1 at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
122 concentration caused the maximum percent reduction in pyocyanin production (82%;
123 $P<0.0001$) over the untreated control with an IC_{50} value of 4.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In addition, PLFE1
124 inhibitory activity was shown to be dose-dependent. The PLFE2 (ethyl acetate extract) was
125 also capable of inhibiting pyocyanin biosynthesis following the same pattern as observed for
126 PLFE1 but not in a drastic manner where approximately 50% of inhibition of this pigment
127 production was observed at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P<0.001$). There was no significant or slight variation
128 in pyocyanin production by H103 strain when exposed to PLFE3 (methanol extract) or PLFE4
129 (water extract). Of all the *P. lentiscus* L. fruit extracts tested for pyocyanin inhibition, PLFE1
130 cyclohexane extract showed remarkably better inhibitory activity and was therefore selected
131 for all further sets of experiments. Further, the inhibitory activity of PLFE1 on phenazine
132 biosynthetic pathway was investigated at the level of gene expression. In the presence of
133 PLFE1 at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, RT-qPCR analyses results showed significant down-regulation of the
134 *phzA* gene involved in the production of phenazine-1-carboxylic acid (PCA), *phzM*, and *phzS*
135 which converts PCA into the derivative pyocyanin (Fig. 1B). However, the expression levels of
136 the *phzH* gene were not significantly different in H103 strain treated with PLFE1 as compared
137 to untreated H103 (Fig. 1B). In summary, the repression of the expression levels of genes
138 involved in phenazine biosynthesis correlate with pyocyanin production inhibition indicating that
139 PLFE1 has the ability to function as a strong inhibitor of the pyocyanin virulence factor in *P.*
140 *aeruginosa* H103 strain.

141

142 ***P. aeruginosa* virulence attenuation by PLFE1**

143 We next sought to evaluate anti-virulence effect of PLFE1 on *P. aeruginosa* strain H103 using
144 human lung A549 cells and *Caenorhabditis elegans* infection models. As depicted in Fig. 2A,

145 the results showed lower LDH release (20%; $P \leq 0.05$) in A549 cells after their infection with
146 H103 treated with PLFE1 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 20h incubation. A549 cells infected with non-treated
147 strain H103 were used as a control. This result revealed that PLFE1 exhibited significant *P.*
148 *aeruginosa* anti-virulence effect in human lung A549 cells. In addition, the impact of PLFE1 on
149 *in vivo* virulence of *P. aeruginosa* strain H103 was assessed using a *C. elegans* fast-killing
150 infection assay. When *C. elegans* worms were placed on a lawn of H103 strain, the percentage
151 of nematodes survival drastically decreased (65%; $P < 0.0001$) after 24h incubation as
152 compared to *C. elegans* fed with *E. coli* OP50 (Fig. 2B). Interestingly, the presence of PLFE1
153 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) significantly protected *C. elegans* from killing by *P. aeruginosa* (27%; $P < 0.0001$)
154 as compared to *C. elegans* when applied to lawns of untreated H103 (Fig. 2B). Altogether,
155 these data indicate that PLFE1 attenuated the virulence of *P. aeruginosa* strain H103 in human
156 lung A549 cells and *C. elegans* infection models.

157

158 **Absence of effect of PLFE1 on *P. aeruginosa* growth and cell viability**

159 The impact of PLFE1 (cyclohexane extract) on the cell growth of *P. aeruginosa* H103 was
160 monitored at 37 °C over the course of 24 h. None of the concentrations assayed (100, 50, 25,
161 12.5, 6.25, 3.12, 1.6 and $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) had an impact on planktonic cell growth of H103 strain
162 as compared to the untreated culture (H103 strain grown in presence of 1 % v/v DMSO)
163 (Supplementary Fig. S1A). Moreover, the effect of PLFE1 on H103 cell viability was evaluated
164 by flow cytometry using BacLight live/dead stain. Similarly, the results showed that at all the
165 concentrations tested, PLFE1 did not affect the cell viability according to normalized events
166 counting of live, injured, and dead cells when compared to the control condition
167 (Supplementary Table S1 and Fig. S1B). Based on these results, it can be concluded that the
168 inhibition of pyocyanin pigment production by *P. lentiscus* L. fruit extract (PLFE1) was achieved
169 without affecting the growth of the bacteria and cell viability, at least *in vitro*.

170

171 **PLFE1 modulates the production of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs)**172 **molecules**

173 We next sought to assess whether the inhibition of pyocyanin production was directly due to
174 PLFE1 on Pqs QS system that is known to tightly regulate pyocyanin biosynthesis. *P.*
175 *aeruginosa* H103 cultures were exposed to different concentrations of PLFE1 (100, 50, 25,
176 12.5, 6.25, 3.12, 1.6 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and then HAQs molecules were extracted twice by ethyl
177 acetate. The production of HAQs was determined using a PAO1 $\Delta pqsA$ CTX-*pqsA::lux*
178 biosensor strain which does not produce HAQs molecules and shows response to exogenous
179 HAQs. The H103 cultures treated with 100, 50, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PLFE1 showed significant
180 reduced HAQs production (Fig. 3A). Additionally, we measured the expression levels of *pqsA*,
181 *pqsH*, *pqsL*, and *pqsR* genes representative of Pqs QS system by using RT-qPCR. The assays
182 were performed after 24h of growth of H103 untreated or treated with 100, 25, and 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
183 PLFE1 (Fig. 3B). The *pqsA*, *pqsH* and *pqsL* genes involved in the biosynthesis of the major
184 molecules from the HAQs family, namely 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline [termed the
185 *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)], its precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and
186 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxide (HQNO) were all significantly repressed upon exposure
187 to PLFE1 at 100 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. However, the expression of *pqsR* (*mvfR*) encoding for the
188 cognate receptor/regulator of HHQ and PQS molecules did not change in the presence of 100
189 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PLFE1. Taken together, these data indicate that PLFE1 extract represses gene
190 expression levels of the Pqs QS system that correlates with the reduction in HAQs molecules
191 production, suggesting that PLFE1 exhibits its anti-pyocyanin production effect possibly
192 through an anti-QS activity.

193

194 PLFE1 leads to increased membrane stiffness

195 Further, we evaluated the effect of PLFE1 on *P. aeruginosa* strain H103 membrane fluidity
196 homeostasis. Planktonic cell growths of H103 exposed to PLFE1 at concentrations of 100, 50,
197 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were assayed for fluorescence anisotropy (FA) using
198 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) fluorescent probe (Fig. 4A). Anisotropy of H103 cells
199 increased in a concentration dependent-manner to achieve a maximum FA value of $0.223 \pm$
200 0.003 ($P < 0.001$) at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PLFE1 in comparison to the FA value of
201 untreated control (0.186 ± 0.002). This result reflects a significant decrease of approximately
202 20% of membrane fluidity (membrane rigidification) revealing physiological changes and
203 adaptations in the cellular envelope of H103 in response to PLFE1 exposure. Interestingly,
204 mRNA expression levels of *sigX* encoding the extracytoplasmic function sigma factor (ECF σ)
205 SigX that is required to maintain cell envelope integrity, and its known representative targets
206 *accA*, *accB*, and *fabY* that are involved in fatty acid biosynthesis were significantly decreased
207 upon exposure of H103 strain to PLFE1 at 100 and $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ when compared to mRNA
208 expression levels in the control condition (untreated H103) (Fig. 4B). Further, *sigX* expression
209 was monitored during growth in the presence of PLFE1 at 100, 25 and $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ by using
210 a transcriptional fusion construction where the *sigX* promoter region was fused to the promoter-
211 less *luxCDABE* cassette in the replicative pAB133 vector (pAB-P*sigX*) (Supplementary Fig.
212 S2). Remarkably, in the presence of PLFE1, the relative bioluminescence output from H103
213 harbouring pAB-P*sigX* increased in a dose dependent-manner reaching significant maximal
214 activity at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ during the transition from the late exponential phase to early stationary
215 phase (Fig. 4C; Supplementary Fig. S2A). However, bioluminescence activity of pAB-P*sigX*
216 decreased significantly in a concentration dependent-manner during the late stationary phase
217 achieving minimal activity at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PLFE1 (Fig. 4C; Supplementary Fig. S2A), in line
218 with the RT-qPCR results presented in Fig. 4B. These results reveal that *P. aeruginosa*

219 exposure to PLFE1 induced increased membrane stiffness suggesting alterations in envelope
220 homeostasis most likely through the activation of the cell wall stress ECF σ SigX. To further
221 validate this hypothesis, we used a $\Delta sigX$ deletion mutant²⁷ to determine the FA in the absence
222 or presence of various concentrations of PLFE1. The FA values appeared to be unaffected in
223 $\Delta sigX$ in response to PLFE1 exposure compared to the control condition (untreated $\Delta sigX$)
224 (Supplementary Fig. S2A). Altogether, these data indicate that PLFE1 contains bioactive
225 membrane-interactive compounds that reduce membrane fluidity, in which the ECF σ SigX
226 seems to play a key role.

227

228 **Isolation and identification of major bioactive compounds of PLFE1**

229 To isolate and identify the major constituents of PLFE1, multiple chemical analyses were
230 performed. The fractionation of PLFE1 by medium pressure liquid chromatography (MPLC)
231 allowed to recover a total of 13 fractions that we labelled as PLFE1-(1-13) (Supplementary
232 Table S2). Thin layer chromatography (TLC) examination showed that the major compounds
233 of PLFE1 were present in the fractions PLFE1-(2-4). These last were then selected for further
234 analyses in order to identify the main compounds present in each fraction. For PLFE1-2, ¹H-
235 NMR spectra, proton signals between 7.36 and 6.78 ppm showed the presence of a tri-
236 substituted aromatic ring. The signal at 5.36 ppm [$t J = 4.6$ Hz, 2H] accounted for an olefinic
237 double bond. The major derivative ginkgolic acid (C17:1) with a molecular formula of C₂₄H₃₈O₃
238 (m/z 373.1 [M-H]⁻) displayed one unsaturation in its aliphatic chain. Ozonolysis reaction of
239 PLFE1-2 allowed to localize the double bond of ginkgolic acid (C17:1) between positions C-8'
240 and C-9' (Fig. 5). LC-ESI-MS analyses corroborated the presence of ginkgolic acid (C17:1) in
241 PLFE1-2 and showed the occurrence of hydroginkgolic acid (C15:0) derivative and a mixture
242 of both ginkgolic acids (C17:1/C15:0) in PLFE1-3 and PLFE1-4, respectively (Fig. 5).
243 Altogether, these results indicate that ginkgolic acid (C17:1) and hydroginkgolic acid (C15:0)

244 are the main metabolites in PLFE1 and might be responsible for *P. aeruginosa* virulence
245 attenuation.

246

247 **Ginkgolic acid-enriched fractions from PLFE1 are involved in virulence** 248 **attenuation of *P. aeruginosa***

249 To further assay whether GA (C17:1), GA (15:1) or a mixture of both GA (C17:1/C15:0) are the
250 main bioactive compounds involved in the anti-virulence activity against *P. aeruginosa*, their
251 effect on pyocyanin production and virulence attenuation in human lung A549 infection model
252 was evaluated. Consistent with the results of pyocyanin inhibition by the crude extract PLFE1,
253 H103 strain treated with GA-enriched fractions showed a dose-dependent reduction of
254 pyocyanin production when compared to untreated H103 (Fig. 6A). Interestingly, the fractions
255 enriched in GA (C17:1) or GA mix of (C17:1)/(C15:0) showed approximately 90% pyocyanin
256 inhibition activity at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The GA (C17:1) and GA (C15:0) displayed an IC_{50} of 6.3 μg
257 mL^{-1} (16.75 μM) and 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (35.75 μM), respectively (Supplementary Fig. S3). Looking
258 at virulence attenuation, H103 strain exposed to GA-enriched fractions showed significant
259 reduced LDH release (20%) as compared to the control condition (H103 untreated) revealing
260 that GA-enriched fractions were able to protect the human lung A549 line cells (Fig. 6B). Taken
261 together, these results provide important insights into the involvement of GA-enriched fractions
262 on the anti-virulence activity against *P. aeruginosa*.

263

264 **Cytotoxicity of PLFE1 and GA-enriched fractions**

265 Our last goal for this study was to investigate the potential of PLFE1 and its GA-enriched
266 fractions to induce cytotoxicity in the human lung A549 cells. As depicted in Fig. 7A, no
267 significant differences in cytotoxicity levels were found between A549 cells treated at various
268 concentrations of crude extract PLFE1 after 1 h incubation as compared to the control condition

269 (untreated A549 cells). However, a moderate cytotoxic effect was observed when A549 cells
270 were incubated for more than 3 h in the presence of PLFE1 at concentrations above 12.5 μg
271 mL^{-1} . Remarkably, when A549 cells were treated with PLFE1 at IC_{50} value of pyocyanin activity
272 inhibition (4.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) there was no differences in cytotoxicity at different time points incubation
273 assayed (1 h, 3 h, 6 h, and 24 h) (Fig. 7B). Moreover, similar interesting trend results were
274 obtained for the GA-enriched fraction mix of both GA (C17:1/C15:0) when tested at 5.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
275 IC_{50} value of pyocyanin inhibition (Fig. 7B). On the other hand, after 3 h incubation, a slight
276 cytotoxicity increase was observed when A549 cells were exposed to enriched fractions of GA
277 (C17:1) and GA (C15:0) separately at their IC_{50} values (6.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$,
278 respectively) (Fig. 7B). However, this cytotoxicity increased by about 3-fold after 24 h exposure
279 as compared to the control condition (A549 cells treated with DMSO). In summary, these
280 results indicate that PLFE1 and its complex GA-enriched fraction (C17:1/C15:0) displayed no
281 significant cytotoxicity in the human lung A549 line cells when tested at their IC_{50} pyocyanin
282 inhibition values.

283

284

285 DISCUSSION

286 Antibiotic-resistant pathogens are threatening individuals and public health over the world to a
287 such extent that new therapeutic strategies need to be developed urgently.^{2,18} The anti-
288 virulence approaches represent an attracting alternative to the unmet clinical need in the
289 treatment of bacterial infections.^{28,29} These new therapies target essentially the prevention of
290 virulence factors production by pathogens, rather than their survival, and they also aim to thwart
291 the regulatory mechanisms controlling their expression.^{19,30} In addition, by targeting essential
292 virulence determinants, the emergence and spread of bacterial resistance will be reduced due
293 to decreased selective pressure and the natural microbiota will be preserved. In line with this
294 scenario, the current study was designed to explore new anti-virulence agents to fight against
295 the multidrug-resistant *P. aeruginosa* that is responsible for many different infections. Thus, we
296 based our research on the traditional medicine reported to treat several infectious diseases. In
297 particular, the fruit of *P. lentiscus* L. is used for the treatment of respiratory tracts infections,
298 and in ointments for articular pain, burn wounds, and ulcer among other traditional uses.^{25,26}

299
300 Our findings show that *P. lentiscus* L. fruit cyclohexane extract (PLFE1) contains potent
301 inhibitory compounds that restrict *P. aeruginosa* virulence by abolishing pyocyanin pigment
302 production, which is known to facilitate colonization of the host and subsequent infection.^{6,7}
303 This anti-virulence activity does not perturb growth and cell viability, which can minimize
304 selective pressures towards the development of resistance compared to conventional
305 antibiotics.²⁸ Nonetheless, additional investigations need to be undertaken to assess whether
306 *P. aeruginosa* can develop resistance towards PLFE1 upon repeated exposure. Further, by
307 exploring the mechanistic behind the anti-pyocyanin activity, we have shown that PLFE1
308 interferes with the HAQs QS-molecules production. Since for *P. aeruginosa* infections QS is

309 the master regulator involved in the expression of many virulence factors such as phenazines,
310 exoproteases (elastase, alkaline protease), siderophores, and toxins among others, its
311 inhibition represents a valuable adjuvant therapy that might be used to potentiate the activity
312 of the available antibiotics applied to handle early *P. aeruginosa* infections.^{19,30} In the last five
313 years there was a large amount of published investigations reporting natural products
314 highlighting their potential in targeting bacterial virulence factors.²¹ Several plant-derived
315 compounds that belong to alkaloids, organosulfurs, coumarins, flavonoids, phenolic acids,
316 phenylpropanoids, terpenoids among other chemical classes have been found to be active
317 against pyocyanin pigment production.²¹ However, there is still a significant lack on the specific
318 underlying molecular mechanisms of action.

319

320 One important finding of the present study was that membrane stiffness in *P. aeruginosa* has
321 significantly increased upon exposure to PLFE1. Furthermore, we demonstrate that PLFE1
322 decreases the expression of the ECF σ SigX, which is involved in the regulation of membrane
323 lipid composition,^{11,15} and thus, triggers modifications on membrane fluidity and homeostasis.
324 Accordingly, our data show a decreased expression levels of *accA* and *accB* encoding subunits
325 of the biotin-dependent enzyme acetyl-CoA carboxylase complex (ACC) that catalyzes the first
326 step in fatty acid biosynthesis in *P. aeruginosa*.³¹ In addition, *fabY* (PA5174) encoding the β -
327 keto acyl synthase (FabY) involved in fatty acid biosynthesis, is another gene that showed
328 decreased expression in presence of the PLFE1. Interestingly, these results mirror those
329 observed in *P. aeruginosa sigX* mutant and over-expressing strains when compared to the
330 wild-type strain.^{11,15,16} Moreover, $\Delta sigX$ cells display reduced membrane fluidity (membrane
331 rigidification), HAQs QS-molecules production, pyocyanin pigment production, and virulence
332 towards a *C. elegans* model.^{9,16} Overall, these data provide evidences that PLFE1 most likely
333 contain membrane-interactive compounds, as it is the case for many plant extracts.^{32,33} PLFE1

334 interaction with membrane lipid bilayers seems to be involved in the increased membrane
335 stiffness, which might trigger the modulation of the ECF σ SigX. Thus, our discoveries propose
336 that PLFE1 exerts its anti-virulence activity through a new potential mechanism that at least
337 involves the ECF σ SigX since no impact of PLFE1 was observed in membrane fluidity of the
338 $\Delta sigX$ mutant strain.

339

340 Herein, the fractionation of PLFE1 led to the isolation and identification of fractions mainly
341 enriched in C17:1 and C15:0 ginkgolic acids (GA) or a mix of both GA (C17:1/C15:0). To the
342 best of our knowledge, the presence of these chemical constituents in *P. lentiscus* L. fruit has
343 never been previously reported. However, according to the literature, GA has already been
344 isolated from *Ginkgo biloba* that has long been used in traditional Chinese medicine.³⁴ The GA
345 are a mixture of several 2-hydroxy-6-alkylbenzoic acid congeners that differ in carbon alkyl
346 group length and unsaturation and are structurally similar to salicylic acid, which is reported to
347 impact negatively the pathogenicity of *P. aeruginosa* PA14 strain by repressing pyocyanin,
348 elastase, and protease production.³⁵ A number of pharmacological effects have been attributed
349 to GA, such as anti-bacterial, anti-fungal, insecticidal, anti-tumour, and neuroprotective effects
350 among others.^{36–39} Moreover, GA are also proven to be effective as anti-biofilm molecules
351 against bacterial pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7 strain, *Staphylococcus aureus*,
352 *Streptococcus mutans*, *Salmonella spp.*, and *Listeria spp.*^{40–42} In line with our results,
353 antibacterial activity studies show that GA did not affect Gram-negative bacteria survival,
354 however, they exhibit strong anti-microbial activity against Gram-positive bacteria.^{39,40,43,44}
355 Interestingly, our results indicate that PLFE1 anti-virulence properties can be mostly attributed
356 to the identified GA-enriched fractions (C17:1, C15:0, C17:1/C15:0) since they are able to
357 function as pyocyanin production inhibitors without negative effect on bacterial growth.
358 Moreover, these GA-enriched fractions are capable of inducing *P. aeruginosa* membrane

359 rigidification (*data not shown*). This result is supported by the fact that the lipid soluble
360 components of the cell wall of Gram-negative bacteria is shown to intercept GA compounds.⁴³

361

362 Following demonstration of PLFE1 and GA-enriched fractions for their *in vitro* anti-virulence
363 properties against *P. aeruginosa*, we assayed them for *in vivo* efficacy using the human lung
364 A549 cells and the nematode *C. elegans* as models host. In both infection models, the virulence
365 of *P. aeruginosa* upon exposure to PLFE1 at a dose of 100 µg/mL is shown to be significantly
366 attenuated. Further, the evaluation of the cytotoxicity of PLFE1 and GA molecules using A549
367 lung human cells indicated no or slight cytotoxicity at IC₅₀ values. Taken together, these studies
368 deliver a promising perspective for the potential future development of PLFE1 or GA molecules
369 as an adjuvant agent to fight against *P. aeruginosa* infections. Nonetheless, it remains to be
370 verified whether PLFE1 or GA molecules have an antibiotic-potentiating activity, both *in vitro*
371 and *in vivo*, against the pathogen *P. aeruginosa*.

372

373 **CONCLUSION**

374 Overall, the data of this study suggest that the anti-virulence efficacy of PLFE1 and GA-
375 enriched fractions might possibly be attributed to their interaction with the lipid bilayer
376 membranes of *P. aeruginosa* resulting in the modification of membrane fluidity. Therefore, the
377 increased membrane stiffness in presence of PLFE1 and GA-enriched fractions appears to be
378 mediated through the modulation of the ECF σ SigX, which is known to be involved in the
379 regulation of *P. aeruginosa* virulence. These findings need further experimental evidences, not
380 least in terms of identifying the specific molecular mechanisms of action leading to impact the
381 ECF σ SigX as being a potential molecular target to alter the expression of virulence in *P.*
382 *aeruginosa*.

383 METHODS

384 **Bacterial strains, media and growth conditions.** The *P. aeruginosa* H103, H103-pAB-PsigX,
385 and H103- Δ sigX²⁷ used in this study are all derivatives of *P. aeruginosa* wild-type PAO1.
386 Planktonic cultures were grown aerobically at 37 °C in LB broth on a rotary shaker (180 rpm)
387 from an initial inoculum adjusted to an OD at 580 nm of 0.08. The antibiotics stock solutions
388 used in this study were sterilized by filtration through 0.22- μ m filters, aliquoted into daily-use
389 volumes and kept at -20 °C.

390

391 **Collection and preparation of *P. lentiscus* L. fruit extracts.** Fruits of *P. lentiscus* L. were
392 collected within the wilaya of Jijel, Algeria, in September 2016, with the collect agreement
393 (48/MC/DGCE/DSPEC/2016) delivered by the Research Centre on Analytical Chemistry
394 (CRAPC). A voucher herbarium specimen is deposited in the herbarium of PNAS laboratory,
395 Université Paris Descartes (France). A sample of 8.98 g of fruits was subjected to a pressurized
396 solvent extraction (PSE) using a Speed Extractor E-914 (Büchi) equipped with four cells (120
397 mL) and a collector with four flat bottom vials (220 mL) successively with cyclohexane, ethyl
398 acetate, methanol, and water. Maximum pressure and temperature were adjusted to 100 bar
399 and to 50 °C, respectively. Two extraction cycles with a hold-on time of 15 min were performed
400 in each case. Solvents were removed under reduced pressure. A total of 4 extracts were
401 obtained (Supplementary Table S3). Solutions at 10 mg mL⁻¹ were prepared in DMSO of each
402 extract and stored at 4 °C until use.

403

404 **Pyocyanin quantification assay.** To perform pyocyanin pigment quantification assay, *P.*
405 *aeruginosa* H103 cells untreated (grown in presence of 1% DMSO) and treated with 100, 50,
406 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6 and 0.8 μ g mL⁻¹ of *P. lentiscus* L. fruit extracts (PLFE1-4) or ginkgolic

407 acid-enriched fractions (PLFE1-(2-4)) were grown on 96-well microtiter plate for 24 h at 37 °C
408 on a rotary shaker (180 rpm). Then, supernatants samples were collected by centrifugation
409 and extracted with chloroform. The chloroform layer (blue layer) was acidified by adding 0.5 M
410 HCl. The absorbance of the HCl layer (pink layer) was recorded at 520nm using the Spark 20M
411 multimode Microplate Reader controlled by SparkControl™ software Version 2.1 (Tecan Group
412 Ltd.) and the data were normalized for bacterial cell density (OD_{580nm}).

413

414 **Virulence attenuation of *P. aeruginosa* using human lung A549 line cells.**The human lung
415 A549 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza,
416 BioWhittaker®) supplemented with 4.5 g L⁻¹ glucose, L-Glutamine, 10% heat-inactivated (30
417 min, 56 °C) fetal bovine serum (FBS), and 100 Units mL⁻¹ each of penicillin and streptomycin
418 antibiotics. Cells were grown at 37 °C under the atmosphere of 5% CO₂ and 95% air with
419 regularly medium change until a confluent monolayer was obtained. The anti-virulence effect
420 of PLFE1 or ginkgolic acid-enriched fractions (PLFE1-(2-4)) on *P. aeruginosa* H103 was
421 determined using an enzymatic assay (Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo
422 Scientific™), which measures lactate dehydrogenase (LDH) released from the cytosol of
423 damaged A549 cells into the supernatant. After overnight incubation with *P. aeruginosa* H103
424 (10^8 CFU mL⁻¹) previously treated or untreated (control condition), the supernatants from
425 confluent A549 monolayers grown on 24-well tissue culture plates were collected and the
426 concentration of the LDH release was quantified. A549 cells exposed to 1X Lysis Buffer were
427 used as a positive control of maximal LDH release (100% lysis) as specified by the
428 manufacturer's recommendations. The background level (0% LDH release) was determined
429 with serum free culture medium. The LDH release assays were also used to determine the
430 cytotoxicity of PLFE1 or ginkgolic acid-enriched fractions (PLFE1-(2-4)) in A549 cells upon
431 direct exposure after 1-, 3-, 6-, and 24-h incubation.

432

433 ***Caenorhabditis elegans* fast-killing infection assay.** The *C. elegans* wild-type Bristol strain
434 N2 worms were grown at 22 °C on nematode growth medium (NGM) agar plates using
435 *Escherichia coli* OP50 as a food source. The *P. aeruginosa*-*C. elegans* fast-kill infection assay
436 was performed as described previously⁴⁵ with minor modifications. Briefly, cultures of *P.*
437 *aeruginosa* H103 strain untreated or treated with PLFE1 at 100 µg mL⁻¹ were seeded on a 24-
438 well plate containing in each well 1 mL of Peptone-Glucose-Sorbitol (PGS) agar. Control wells
439 were seeded with 25 µL of *E. coli* OP50 from an overnight culture. The plate was then incubated
440 at 37 °C for 24 h to make bacterial lawns and then shifted to 22 °C for 4 h. For each assay, 15
441 to 20 L4-synchronized worms were added to the killing and control lawns and incubated at 22
442 °C. Worm survival was scored at 4-, 6-, 8-, 20-, and 24-h after the start of the assay, using an
443 Axiovert S100 optical microscope (Zeiss).

444

445 **Bacterial cell viability assays by flow cytometry.** Cell viability assays of *P. aeruginosa* H103
446 cells untreated and treated by different concentrations of *P. lentiscus* L. fruit extract (PLFE1)
447 were assessed by using the LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit, for
448 flow cytometry (Invitrogen, Molecular Probes). Briefly, *P. aeruginosa* H103 untreated and
449 treated suspensions were diluted in filter-sterilized PBS to reach a final density of 1 x 10⁶ CFU
450 mL⁻¹, then stained following the manufacturer's instructions. The data were acquired using
451 CytoFlex S flow cytometer (Beckman coulter Life science). An aliquot of cells was killed with
452 100% ethanol and used as a control of death cells. The SYTO9 stained cells were detected by
453 an excitation with 22 mW blue laser at 488 and with emission wavelength at 525 nm (green,
454 with band pass filter of 40 nm), while the PI (Propidium iodide) stained cells were detected by
455 690 nm (red, with band pass filter of 50 nm).

456

457 **Extraction and quantification of HAQs.** Planktonic cultures of *P. aeruginosa* H103 untreated
458 (control DMSO 1%) and treated by 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PLFE1
459 were subjected to HAQ molecules extraction following the technique described in a previous
460 study.⁴⁶ HAQs were quantified by a combined spectrophotometer/luminometer microplate
461 assay using the biosensor strain PAO1 *pqsA* CTX-*lux::pqsA*.⁴⁷ The HAQ biosensor strain was
462 grown overnight and OD was measured and adjusted with fresh LB medium to achieve OD_{580nm}
463 of 1. For each test well, 5 μL of HAQs crude extracts were diluted in 100 μL of LB and added
464 to 100 μL of 1 in 50 dilution of the HAQ biosensor strain. Further, bioluminescence and OD_{580nm}
465 were monitored in specialized white sided and clear bottom 96-well microtiter plate every 15
466 min for 24 h at 37 °C using the Spark 20M multimode Microplate Reader controlled by
467 SparkControl™ software Version 2.1 (Tecan Group Ltd.). Both HHQ and PQS synthetic
468 standards (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 5 μM , used as positive controls, were
469 added to 1 in 100 dilution of the HAQ biosensor strain, as both activate bioluminescence
470 production. The recorded bioluminescence as relative light units (R.L.U) were normalized to
471 OD_{580nm} of cultures suspensions.

472

473 **Membrane fluidity measurement by fluorescence anisotropy.** Fluorescence anisotropy
474 analysis of *P. aeruginosa* cells were performed as previously described.¹⁶ Briefly, cell pellets
475 of *P. aeruginosa* H103 untreated (control DMSO 1%) and treated by 100, 50, 25, 12.5, 6.25,
476 3.12, 1.6 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PLFE1 were washed two times ($7500 \times g$, 5 min, 25 °C) in 0.01 M
477 MgSO_4 and resuspended in the same wash solution to reach an OD_{580nm} of 0.1. One μL of a 4
478 mM of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) stock solution (Sigma-Aldrich) in tetrahydrofuran
479 was added to 1 mL aliquot of the resuspended cultures and incubated in the dark for 30 min at
480 37 °C to allow the probe to incorporate into the cytoplasmic membrane. Measurement of the
481 fluorescence polarization was performed using the Spark 20M multimode Microplate Reader,

482 equipped with an active temperature regulation system (Te-Cool™, Tecan Group Ltd.).
483 Excitation and emission wavelengths were set to 365 nm and 425 nm, respectively, and the
484 Fluorescence Anisotropy (FA) was calculated according to Lakowicz.⁴⁸ Three measurements
485 were performed for each sample and data were recorded using SparkControl™ software
486 (Version 2.1, Tecan Group Ltd.). The relationship between fluorescence polarization and
487 membrane fluidity is an inverse one, where increasing anisotropy values correspond to a more
488 rigid membrane and vice versa. All values are reported as means of triplicate analyses for each
489 experimental variable.

490

491 **Transcriptional fusion *PsigX::luxCDABE* construction and *sigX* promoter activity**
492 **analysis in response to PLFE1.** The promoter region of the *sigX* gene (*PsigX*) was amplified
493 by PCR with primers *PsigX-SacI*-F and *PsigX-SpeI*-R (Supplementary Table S4,) incorporating
494 *SacI* and *SpeI* linkers, respectively. The promoter region of *sigX* gene was fused to the
495 *luxCDABE* cassette in the promoterless pAB133 vector.⁴⁹ Upon amplification, DNA was
496 digested with the appropriate restriction enzymes, and cloned into pAB133 generating pAB-
497 *PsigX* vector. The pAB-*PsigX* plasmid was then transformed separately into one shot™ *E. coli*
498 TOP10 competent cells (Invitrogen). The constructions were confirmed by DNA sequencing
499 (Sanger sequencing services, Genewiz). Finally, the plasmids were transferred by
500 electroporation into *P. aeruginosa* H103 strain. Promoter activity was analysed by monitoring
501 bioluminescence during course time.

502

503 **Reverse transcription-quantitative PCR analyses (RT-qPCR).** Total RNAs from three
504 independent H103 untreated and treated cultures with PLFE1 at 100, 25, and 6.25 µg mL⁻¹
505 were isolated by the hot acid-phenol method²⁷ followed by treatment with Turbo DNA-free™ kit
506 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Synthesis of cDNAs and RT-qPCR were

507 achieved as previously described⁵⁰ using the oligonucleotides listed in Supplementary Table
508 S4. The mRNAs levels were calculated by comparing the threshold cycles (Ct) of target genes
509 with those of control sample groups and the relative quantification was measured using the
510 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method⁵¹ using DataAssistTM software (Applied Biosystems).

511

512 **PLFE1 fractionation.** Two hundred mg of PLFE1 were subjected to fractionation by medium
513 MPLC on 9.6 g of silice 60 M with cyclohexane/ethyl acetate as mobile phase solvent mixture
514 with increasing polarity. A total of 13 fractions were recovered and designated PLFE1-(1-13)
515 (Supplementary Table S2)

516

517 **Structure determination of compounds present in PLFE1-(2-4) fractions by NMR and**

518 **ozonolysis.** To determine the structure of the main compounds of PLFE1-(2-4), ¹D and ²D

519 NMR experiments were conducted in a Bruker 400 MHz spectrometer apparatus and recorded

520 in deuterated chloroform (CDCl₃). To identify the double bond position of the main compound

521 identified in PLFE1-2, an ozonolysis reaction was carried out. Briefly, a solution of 10 mg (0.027

522 mmol, 1.0 equiv) of PLFE1-2 was put in a round bottom flask containing 20 mL of distilled

523 dichloromethane and a small amount of Sudan III. A stream of ozone (O₃) was bubbled into

524 the solution at -78 °C until the pink solution became colorless (10 min). Then, 200 µL of

525 dimethyl sulphide ((CH₃)₂S) (2.7 mmol, 100 equiv) were added to the reaction mixture and

526 stirred for 1 h at 20 °C. From the reaction mixture, 1 µl was directly analyzed by GC-MS.

527

528 **Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses.** The GC-MS analyses were

529 carried out in a Hewlett Packard GC 6890/MSD 5972 apparatus equipped with HP-5 (30 m x

530 0.25 mm x 0.25 µm). Carried gas was Ar with a flow of 0.9 mL min⁻¹, split 1:20, oven was

531 programmed increasing from 180°C to 270°C at 8°C min⁻¹ with an initial and final hold of 1 and

532 65 min, respectively. The inlet and GC-MS interface temperature were kept at 240 °C. The
533 temperature of EI (electron impact) 70 eV was 220°C with full scan (80-500 m/z). The injection
534 volume was 1 µL. Identification of constituents was achieved by comparing their mass spectra
535 with those of the Mass Spectra Library (NIST 98) compounds.

536

537 **Statistical analyses.** Statistical significance was evaluated using R ([https://www.r-](https://www.r-project.org)
538 [project.org](https://www.r-project.org)).⁵² The data were statistically analyzed using two-sample unpaired two-tailed *t* test
539 to calculate *P* values. The mean with standard error of the mean (SEM) of at least three
540 independent biological experiments were calculated and plotted. *C. elegans* survival curves
541 were prepared using R to perform a statistical log-rank (Mantel-Cox) test.

542

543 DATA AVAILABILITY

544 The authors declare that all relevant data supporting the findings of the study are available in
545 this article and its Supplementary Information files, or from the corresponding author upon
546 request.

547

548 ACKNOWLEDGMENTS

549 The LMSM is supported by the Région Normandie (France), Evreux Portes de Normandie
550 (France) and European FEDER funds. PNAS and CRAPC are partners of the European
551 Union's H2020-MSCA-RISE-2015 EXANDAS (Exploitation of aromatic plants' by-products for
552 the development of novel cosmeceuticals and food supplements, Grant Agreement 691247).

553 A.T. is supported by a post-doctoral fellowship from European Union (FEDER) and Région
554 Normandie (France). D.T. is supported by a doctoral fellowship from the Région Normandie
555 (France). C. A. was the recipient of a postgraduate fellowship from Campus France and FUNAI
556 (Nigeria). S.O is supported by a CONICYT's scholarship (Comisión Nacional de Investigación
557 Científica y Tecnológica from Chile). The funders had no role in study design, data collection
558 and interpretation, or the decision to submit this work for publication. We gratefully
559 acknowledge Prof. Paul Williams (Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham)
560 for providing PAO1 $\Delta pqsA$ CTX- *pqsA::lux* biosensor strain and Mr. Abdelhamid Boudjerda for
561 plant material collection.

562

563 COMPETING INTERESTS

564 The authors declare no competing interests.

565

566 AUTHOR CONTRIBUTIONS

567 A.T., S.C., E.B., S.B., R.G., and O.L. conceived and designed the experiments; A.T., S.O.,
568 O.C.A., N.B., O.M., and D.T. conducted experiments and analyzed the data; A.T., S.C., P.C.,
569 E.B., S.O., M.K., S.C., S.M., M.F., and N.O. contributed to the writing of the manuscript. All
570 authors proofread the final draft and approved the final manuscript.

571

572 **FIGURE LEGENDS**

573 **Figure 1.** *P. lentiscus* L. fruit extract (PLFE) is a potent inhibitor of pyocyanin production in *P.*
 574 *aeruginosa* strain H103. **(A)** Effect of various concentrations of *P. lentiscus* cyclohexane
 575 (PLFE1), ethyl acetate (PLFE2), methanol (PLFE3), and water (PLFE4) extracts on pyocyanin
 576 production. **(B)** Relative expression levels of representative genes from phenazine
 577 biosynthesis pathway in H103 treated with PLFE1 at 100, 25, and 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ compared to
 578 the relative mRNA levels in the control condition (H103 untreated). Values represent the mean
 579 (\pm SEM) of three independent assays. Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: ****,
 580 $P < 0.0001$; ***, $P = 0.0001$ to 0.001 ; **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (Not Significant), $P \geq 0.05$.
 581

582 **Figure 2.** Virulence attenuation on *P. aeruginosa* by PLFE1. **(A)** Anti-virulence effects of
 583 PLFE1 in human A549 lung cells infection model. The presence of PLFE1 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)
 584 significantly protected A549 lung cells from lysis after 20h infection. Data are presented as the
 585 mean \pm SEM values of four independent experiments performed in duplicate. ** $P = 0.001$ to
 586 0.01 (two-tailed *t* test) versus untreated cells. **(B)** *P. aeruginosa* H103 virulence attenuation in
 587 a *C. elegans* infection model by PLFE1. Sixty L4-stage nematodes per experimental group
 588 were placed on lawns of *E. coli* OP50 (black) or H103 strain in the absence (red) or presence
 589 of PLFE1 at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (green). Alive nematodes were scored at 4-, 6-, 8-, 20- and 24-h after
 590 the start of the assay. ****, $P < 0.0001$ (log-rank [Mantel-Cox] test) versus untreated cells.
 591

592 **Figure 3.** PLFE1 decreases HAQ-molecules production. **(A)** Normalized mean maximal
 593 bioluminescence output from the HAQ-biosensor strain in the presence of crude ethyl acetate
 594 HAQs extracts prepared from cultures of H103 treated with different concentrations of PLFE1
 595 compared to positive control conditions (HHQ and PQS at $5 \mu\text{M}$; HAQs crude ethyl acetate
 596 extract from H103 untreated) and to negative control conditions (HAQs crude ethyl acetate
 597 extract from HAQ-biosensor strain and LB medium). **(B)** Relative expression levels of
 598 representative genes from HAQ QS system in H103 treated with PLFE1 at 100, 25, and 6.25
 599 $\mu\text{g mL}^{-1}$ compared to the relative mRNA levels in the control condition (H103 untreated). Values
 600 represent the mean (\pm SEM) of three independent assays. Statistics were achieved by a two-
 601 tailed *t* test: ***, $P = 0.0001$ to 0.001 ; **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (Not Significant),
 602 $P \geq 0.05$.
 603

604 **Figure 4.** PLFE1 induces membrane stiffness. **(A)** Fluorescence anisotropy (membrane
605 fluidity) measurements in *P. aeruginosa* strain H103 exposed to various concentrations of
606 PLFE1 compared to the control condition (H103 untreated). **(B)** Relative expression levels of
607 *sigX* encoding the SigX extracytoplasmic function sigma factor (ECF σ) and its known target
608 genes (*accA*, *accB*, and *fabY*) involved in fatty acid biosynthesis in H103 treated with PLFE1
609 at 100, 25, and 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ compared to the relative mRNA levels in the control condition
610 (H103 untreated). **(C)** Relative bioluminescence levels of H103 harboring the pAB-*PsigX*
611 plasmid (*sigX* promoter region) treated with PLFE1 at 100, 25, and 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ compared to
612 the relative bioluminescence levels in the control condition (H103-pAB-*PsigX* untreated). Data
613 at both transition and stationary phases are displayed. Values represent the mean (\pm SEM) of
614 three independent assays. Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: ****, $P < 0.0001$; ***,
615 $P = 0.0001$ to 0.001 ; **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (Not Significant), $P \geq 0.05$.

616
617 **Figure 5.** Chemical structures of ginkgolic acid derivatives identified in PLFE1-(2-4).

618
619 **Figure 6.** Effect of GA-enriched fractions from PLFE1 on *P. aeruginosa* virulence. **(A)**
620 Pyocyanin production upon exposure to different concentrations of GA-enriched fractions. **(B)**
621 Anti-virulence of GA-enriched in human A549 lung cells infection model. The presence of GA-
622 enriched fractions ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) significantly protected A549 lung cells from lysis after 20 h
623 infection. Data are presented as the mean \pm SEM values of four independent experiments
624 performed in duplicate. Statistics were achieved by a two-tailed *t* test: **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *,
625 $P = 0.01$ to 0.05 .

626
627 **Figure 7.** Cytotoxic effect of PLFE1 and its GA-enriched fractions on human lung A549 line
628 cells. **(A)** PLFE1 was assayed at different concentrations. **(B)** Cytotoxicity of GA-enriched
629 fractions exhibiting pyocyanin production inhibition. LDH release was determined at 1 h, 3 h, 6
630 h, and 24 h. DMSO was used as a vehicle control. Data are displayed as the mean \pm SEM
631 values of four independent experiments performed in duplicate. Statistics were achieved by a
632 two-tailed *t* test: ***, $P = 0.0001$ to 0.001 ; **, $P = 0.001$ to 0.01 ; *, $P = 0.01$ to 0.05 ; NS (Not Significant),
633 $P \geq 0.05$.

634
635

636 **REFERENCES**

- 637 1. Pendleton, J. N., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE
638 pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* **11**, 297–308 (2013).
639
- 640 2. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and
641 development of new antibiotics. *World Health Organization* (2017).
642
- 643 3. Malhotra, S., Hayes, D. & Wozniak, D. J. Cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*:
644 the host-microbe interface. *Clin Microbiol Rev* **32**, e00138-18 (2019).
645
- 646 4. Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A
647 paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 39 (2017).
648
- 649 5. Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P. & Newman, D. K. Rethinking “secondary”
650 metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* **2**, 71–78 (2006).
651
- 652 6. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas*
653 *aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**, 599–606 (2004).
654
- 655 7. Hall, S. *et al.* Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas*
656 *aeruginosa*. *Toxins* **8**, 236 (2016).
657
- 658 8. Mavrodi, D. V. *et al.* Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and
659 phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **183**, 6454–6465
660 (2001).
661
- 662 9. Gicquel, G. *et al.* The extra-cytoplasmic function sigma factor *sigX* modulates biofilm
663 and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**, e80407 (2013).
664
- 665 10. Chevalier, S. *et al.* Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas*
666 *aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* **1862**, 706–721 (2019).
667
- 668 11. Blanka, A. *et al.* Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its
669 implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* **196**, 345–356 (2014).
670
- 671 12. Otero-Asman, J. R., Wettstadt, S., Bernal, P. & Llamas, M. A. Diversity of
672 extracytoplasmic function sigma (σ^{ECF}) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. *Mol*
673 *Microbiol* **112**, 356–373 (2019).
674
- 675 13. Schulz, S. *et al.* Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas*
676 *aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLOS*
677 *Pathog* **11**, e1004744 (2015).

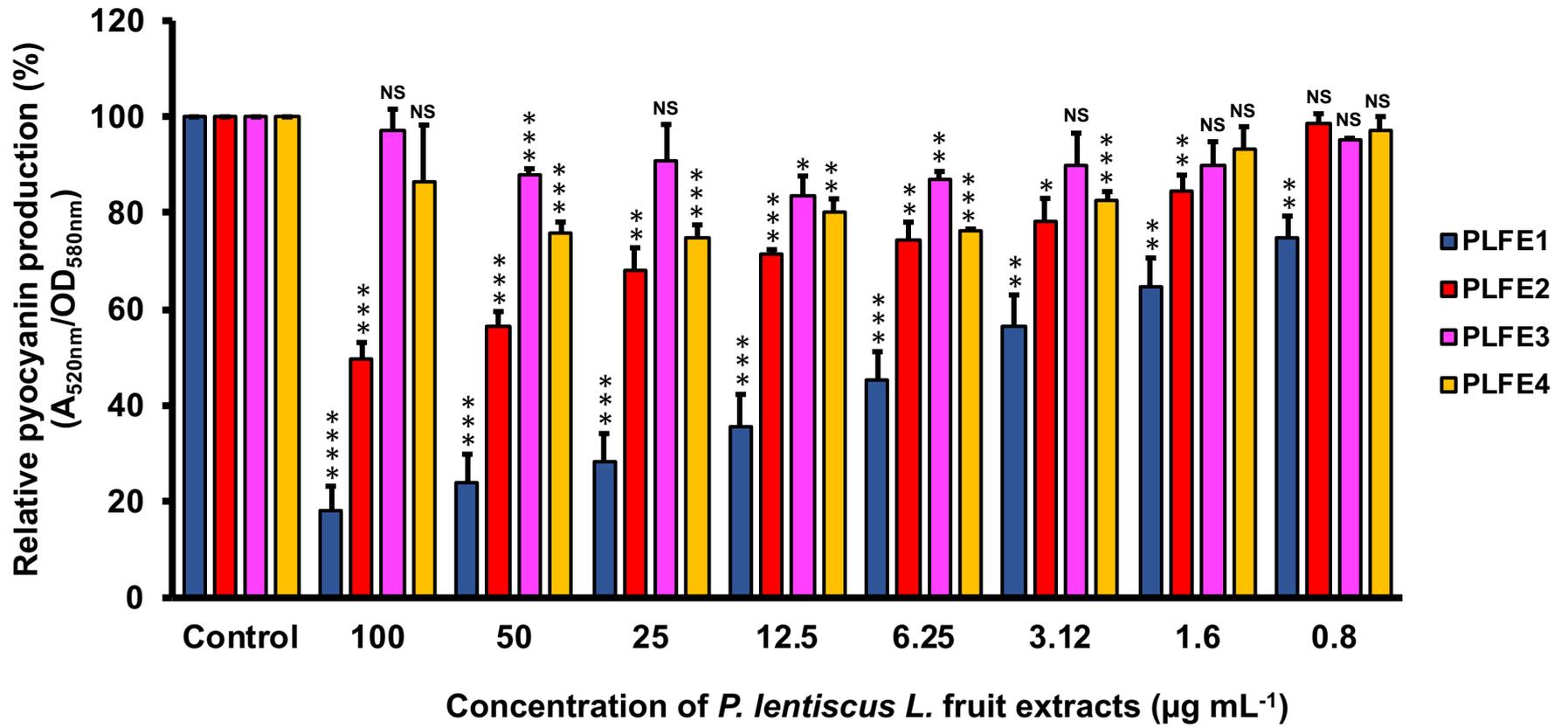
- 678
679 14. Duchesne, R. *et al.* A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa*
680 outer membrane composition. *J Proteomics* **94**, 451–459 (2013).
681
- 682 15. Boechat, A. L., Kaihama, G. H., Politi, M. J., Lépine, F. & Baldini, R. L. A novel role for
683 an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas*
684 *aeruginosa*. *PLoS One* **8**, e84775 (2013).
685
- 686 16. Fléchard, M. *et al.* The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and
687 membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* **8**, 17212 (2018).
688
- 689 17. Brinkman, F. S. L., Schoofs, G., Hancock, R. E. W. & De Mot, R. Influence of a putative
690 ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas*
691 *aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **181**, 4746–4756 (1999).
692
- 693 18. Wagner, S. *et al.* Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa*
694 infections. *J Med Chem* **59**, 5929–5969 (2016).
695
- 696 19. Soukarieh, F., Williams, P., Stocks, M. J. & Cámara, M. *Pseudomonas aeruginosa*
697 quorum sensing systems as drug discovery targets: Current position and future perspectives.
698 *J Med Chem* **61**, 10385–10402 (2018).
699
- 700 20. Mahady, G. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections.
701 *Curr Pharm Des* **11**, 2405–2427 (2005).
702
- 703 21. Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J. & Trentin, D. S. Plant natural products
704 targeting bacterial virulence factors. *Chem Rev* **116**, 9162–9236 (2016).
705
- 706 22. Calvert, M. B., Jumde, V. R. & Titz, A. Pathoblockers or antivirulence drugs as a new
707 option for the treatment of bacterial infections. *Beilstein J Org Chem* **14**, 2607–2617 (2018).
708
- 709 23. AL-Saghir G., M. & Porter M., D. Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L.
710 (*Anacardiaceae*). *Am J Plant Sci* **3**, 12–32 (2012).
711
- 712 24. Zohary, M. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palest J Bot Jerusalem* **5**, 187–
713 228 (1952).
714
- 715 25. Rauf, A. *et al.* Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus
716 *Pistacia*. *Biomed Pharmacother* **86**, 393–404 (2017).
717
- 718 26. Bozorgi, M. *et al.* Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*,
719 and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology.
720 *ScientificWorldJournal* **2013**, 219815 (2013).
721

- 722 27. Bouffartigues, E. *et al.* Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is
723 dependent mainly on the *sigX* sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* **194**, 4301–
724 4311 (2012).
725
- 726 28. Rasko, D. A. & Sperandio, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated
727 disease. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 117–128 (2010).
728
- 729 29. Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C. & Otto, M. Different drugs for bad bugs: Antivirulence
730 strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 457–471 (2017).
731
- 732 30. Martínez, O. F., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M. & Franco, O. L. Recent advances in anti-
733 virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains,
734 toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Front Cell Infect*
735 *Microbiol* **9**, 74 (2019).
736
- 737 31. Kondakova, T. *et al.* Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*.
738 *Chem Phys Lipids* **190**, 27–42 (2015).
739
- 740 32. Kopeč, W., Telenius, J. & Khandelia, H. Molecular dynamics simulations of the
741 interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. *FEBS J* **280**,
742 2785–2805 (2013).
743
- 744 33. Tsuchiya, H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism
745 applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules* **20**, 18923–18966 (2015).
746
- 747 34. Mahadevan, S. & Park, Y. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.:
748 Chemistry, efficacy, safety, and uses. *J Food Sci* **73**, R14–R19 (2008).
749
- 750 35. Prithiviraj, B. *et al.* Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by
751 salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*.
752 *Infect Immun* **73**, 5319–5328 (2005).
753
- 754 36. van Beek, T. A. & Montoro, P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba*
755 leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A* **1216**, 2002–2032 (2009).
756
- 757 37. Ahlemeyer, B. & Krieglstein, J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. *Cell Mol*
758 *Life Sci* **60**, 1779–1792 (2003).
759
- 760 38. Satyan, K. S., Jaiswal, A. K., Ghosal, S. & Bhattacharya, S. K. Anxiolytic activity of
761 ginkgolic acid conjugates from Indian *Ginkgo biloba*. *Psychopharmacology (Berl)* **136**, 148–
762 152 (1998).
763
- 764 39. Yang, X., Zhu, W., Chen, J., Qian, Z. & Xie, J. Study on anti-bacterium activity of
765 ginkgolic acids and their momomers. *Zhong Yao Cai* **27**, 661–663 (2004).

- 766
767 40. He, J. *et al.* Effects of ginkgoneolic acid on the growth, acidogenicity, adherence, and
768 biofilm of *Streptococcus mutans in vitro*. *Folia Microbiol (Praha)*. **58**, 147–153 (2013).
769
- 770 41. Lee, J. H., Kim, Y. G., Ryu, S. Y., Cho, M. H. & Lee, J. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba*
771 extract inhibit *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Int J*
772 *Food Microbiol* **174**, 47–55 (2014).
773
- 774 42. Wu, Y., Park, K. C., Choi, B. G., Park, J. H. & Yoon, K. S. The antibiofilm effect of *Ginkgo*
775 *biloba* extract against *Salmonella* and *Listeria* isolates from poultry. *Foodborne Pathog Dis* **13**,
776 229–238 (2016).
777
- 778 43. Hua, Z., Wu, C., Fan, G., Tang, Z. & Cao, F. The antibacterial activity and mechanism
779 of ginkgolic acid C15:1. *BMC Biotechnol* **17**, 5 (2017).
780
- 781 44. Choi, J. G. *et al.* Antibacterial activity of hydroxyalkenyl salicylic acids from sarcotesta
782 of *Ginkgo biloba* against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Fitoterapia* **80**, 18–20 (2009).
783
- 784 45. Blier, A. S. *et al.* C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and
785 toxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **157**, 1929–1944 (2011).
786
- 787 46. Tahrioui, A. *et al.* Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs
788 are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation. *npj*
789 *Biofilms Microbiomes* **5**, 15 (2019).
790
- 791 47. Fletcher, M. P., Diggle, S. P., Cámara, M. & Williams, P. Biosensor-based assays for
792 PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nat Protoc* **2**,
793 1254–1262 (2007).
794
- 795 48. Lakowicz, J. R. Fluorescence anisotropy in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*
796 (ed. Lakowicz, J. R.) 353–382 (Springer, 2006).
797
- 798 49. Bazire, A. *et al.* The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by
799 nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**, 3001–3010 (2010).
800
- 801 50. Bouffartigues, E. *et al.* The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads
802 to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front Microbiol* **6**, 630
803 (2015).
804
- 805 51. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
806 *Nucleic Acids Res* **29**, 45e–45 (2001).
807
- 808 52. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing
809 (2017).

Figure 1

A



B

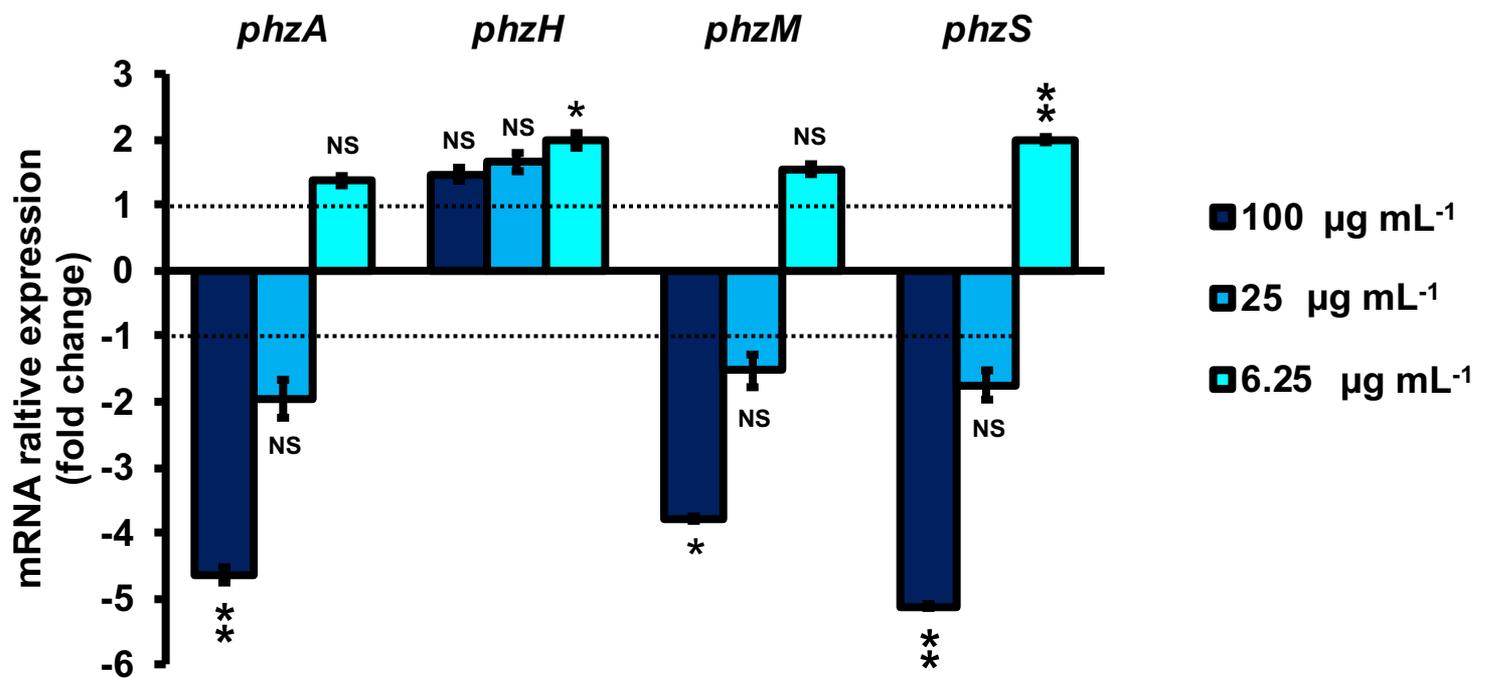
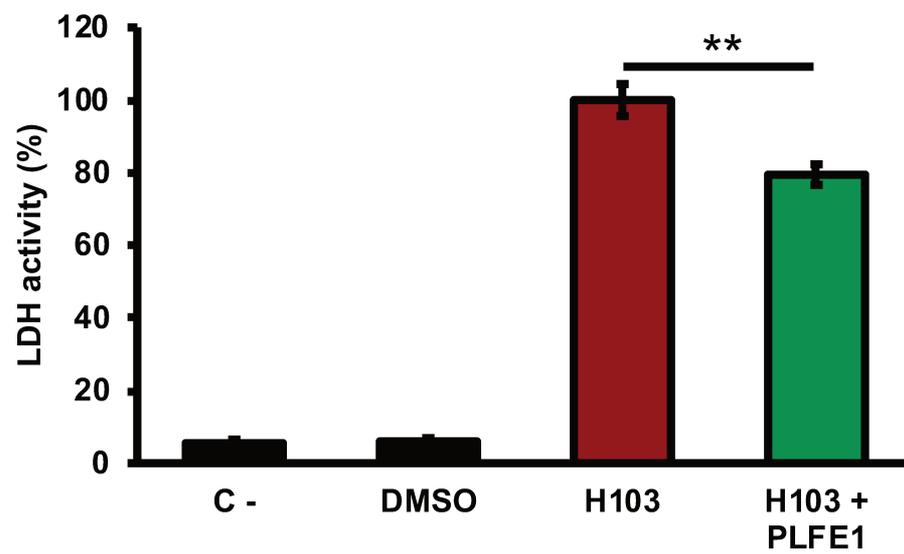


Figure 2

A



B

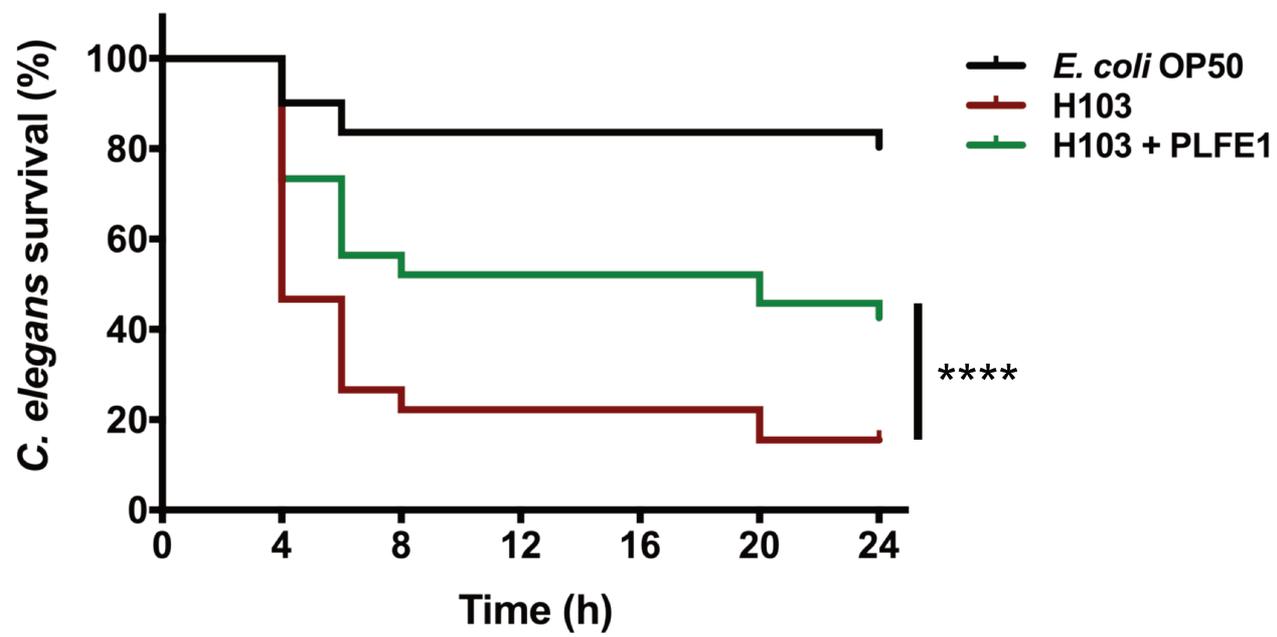
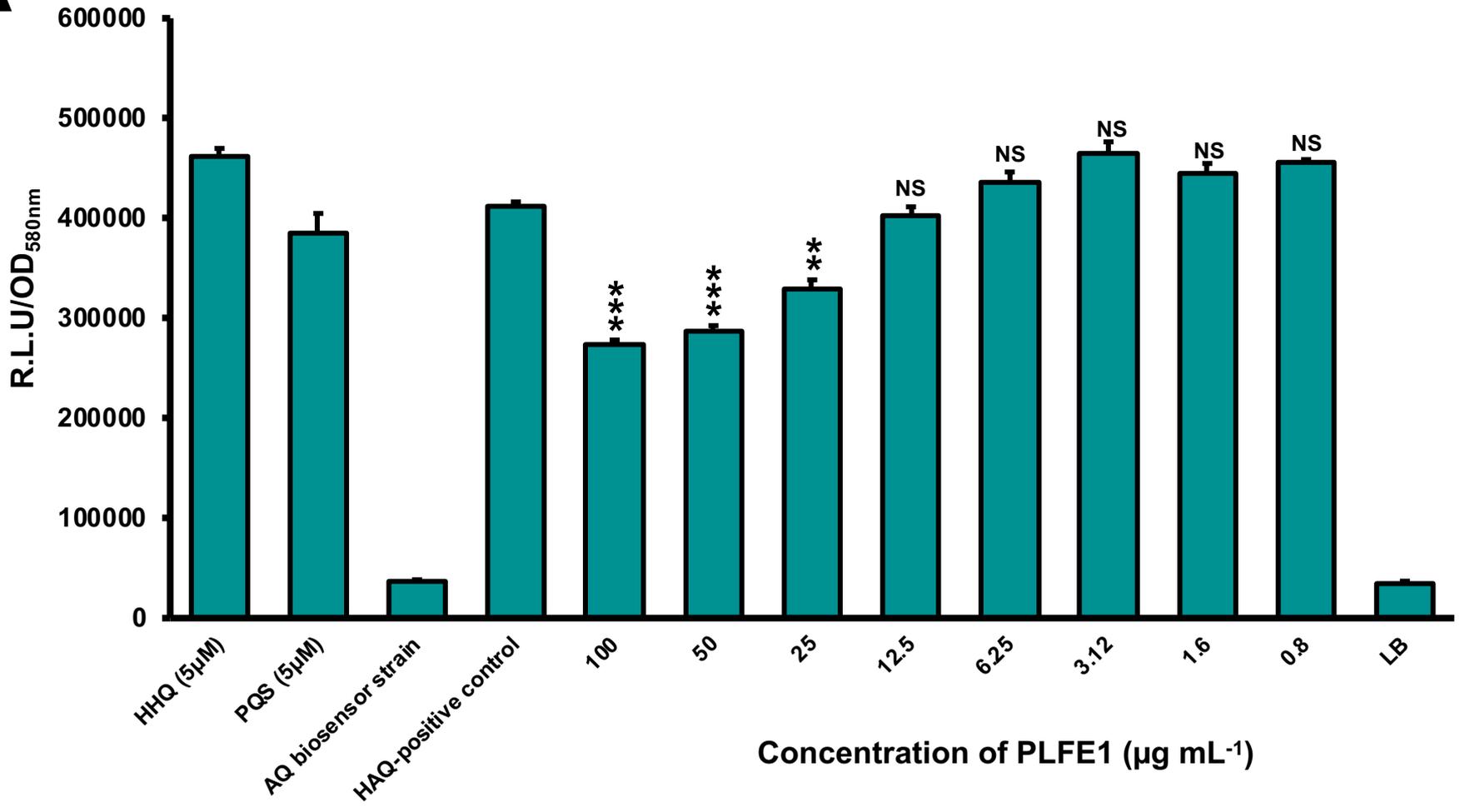


Figure 3

A



B

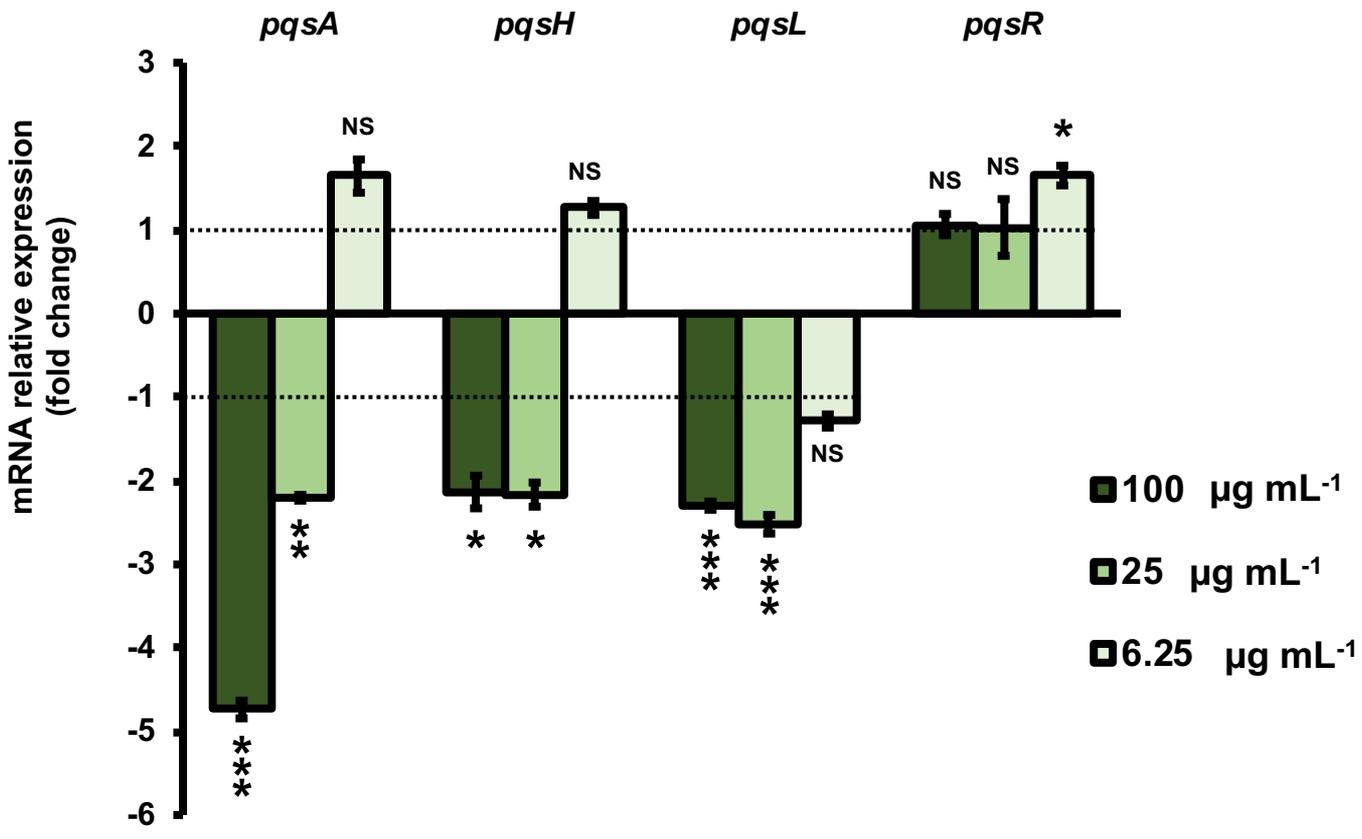
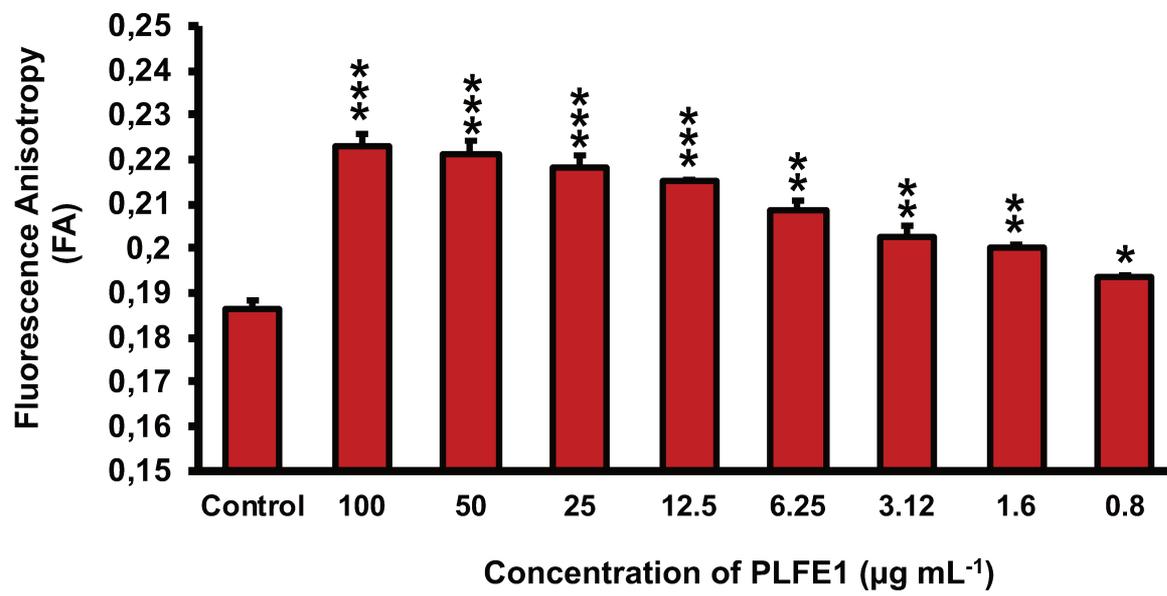
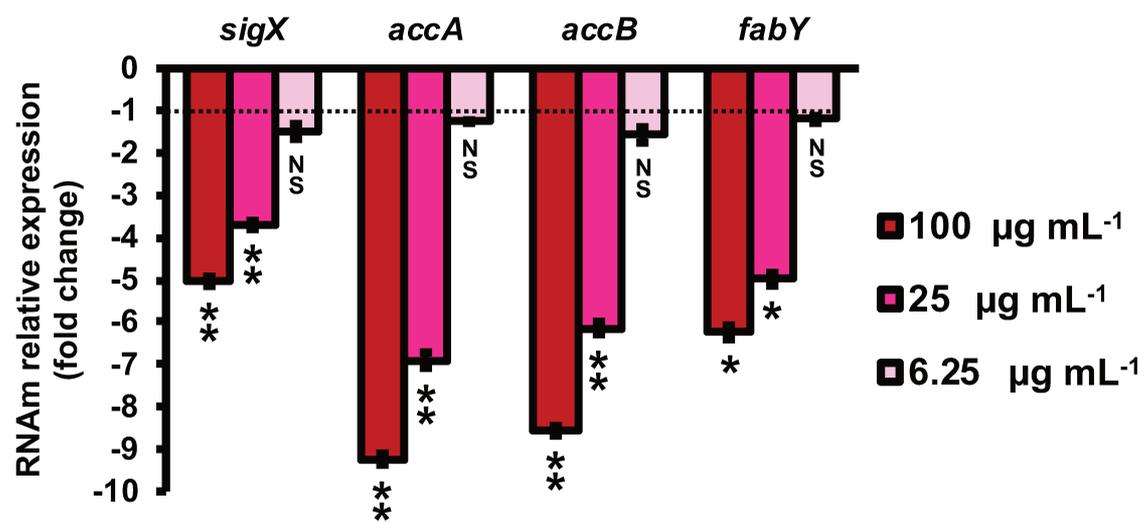


Figure 4

A



B



C

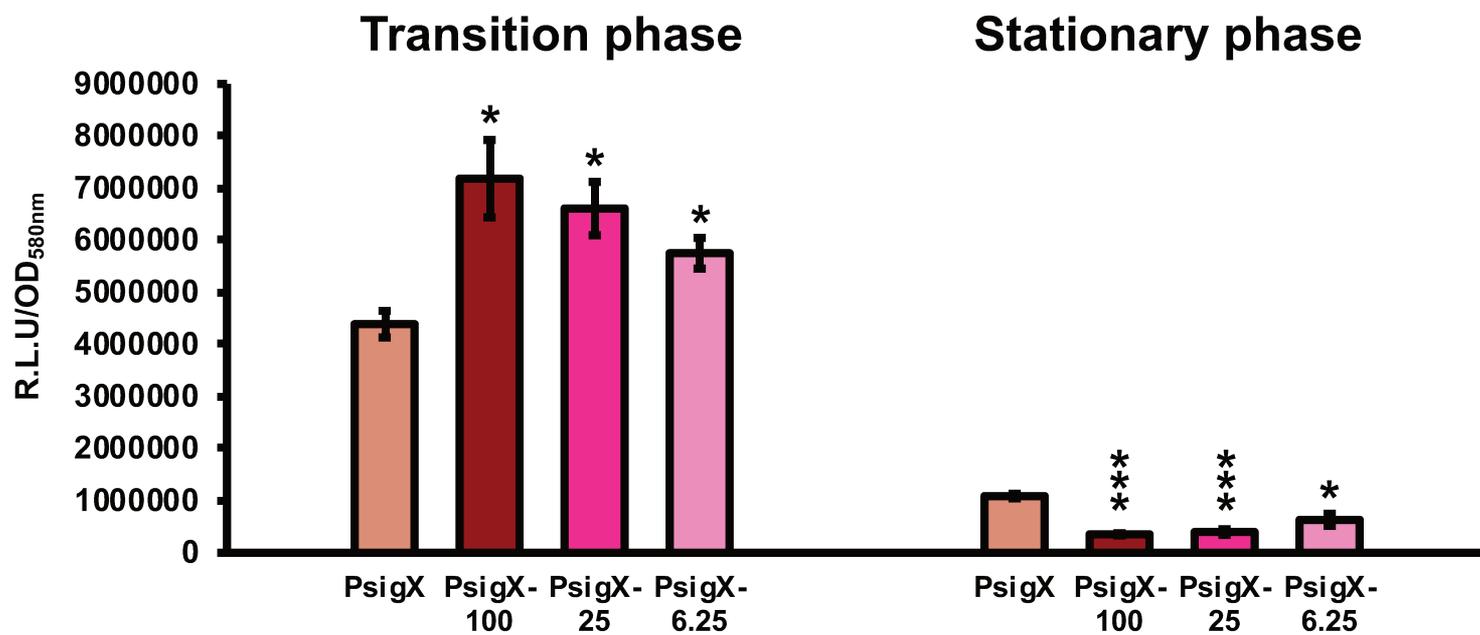


Figure 5

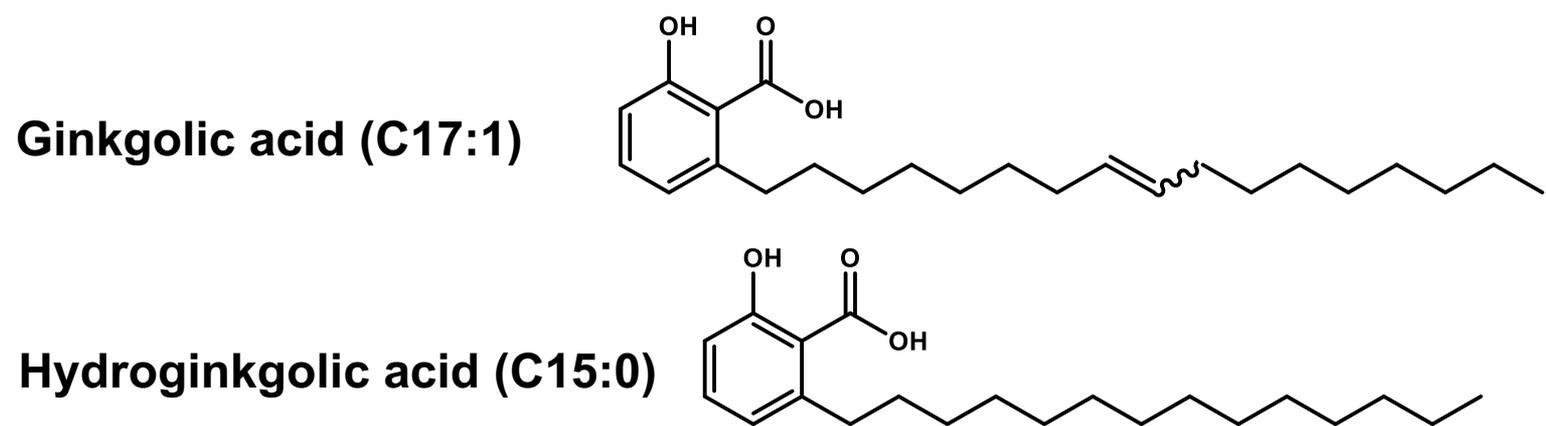
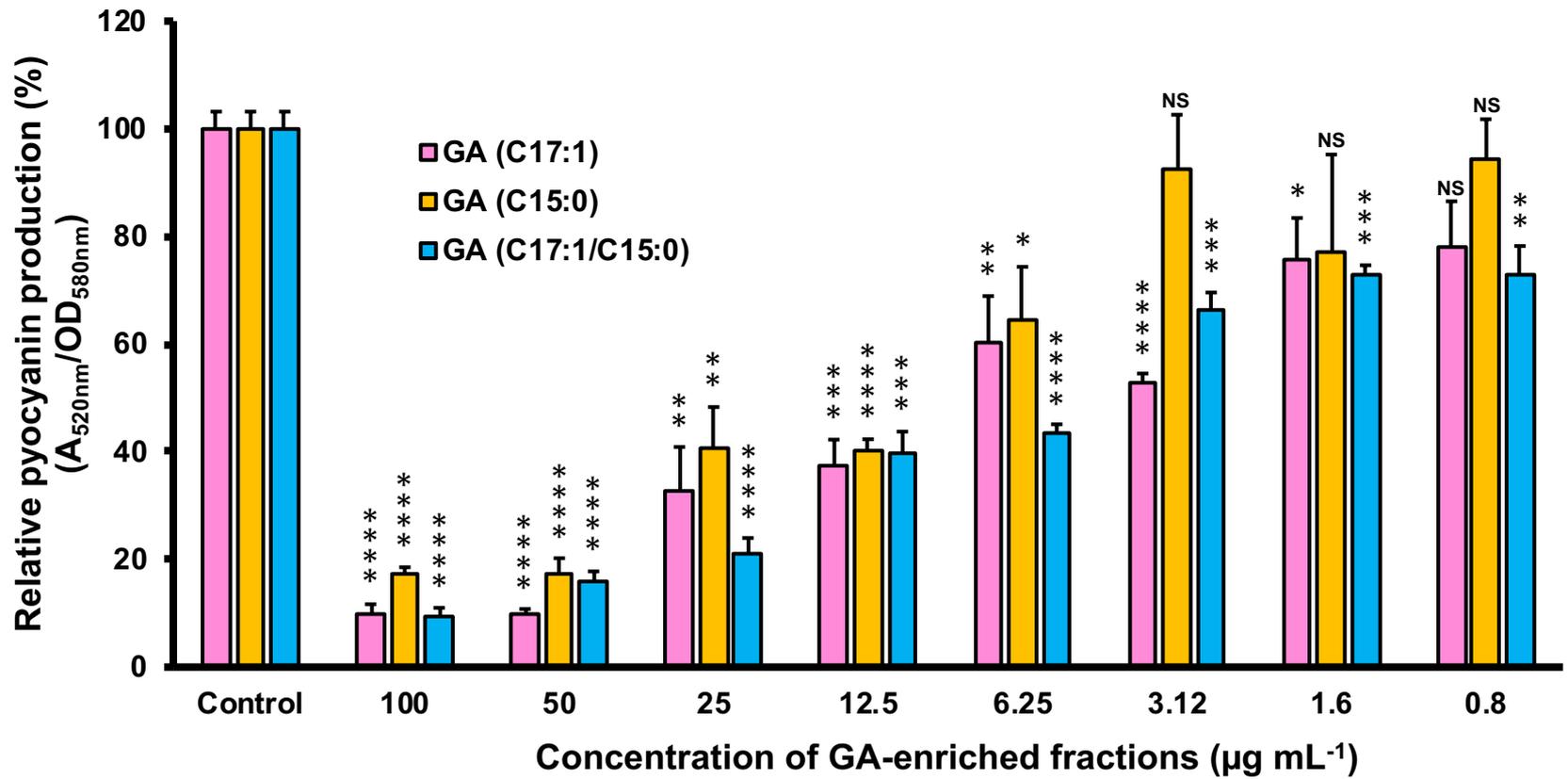


Figure 6

A



B

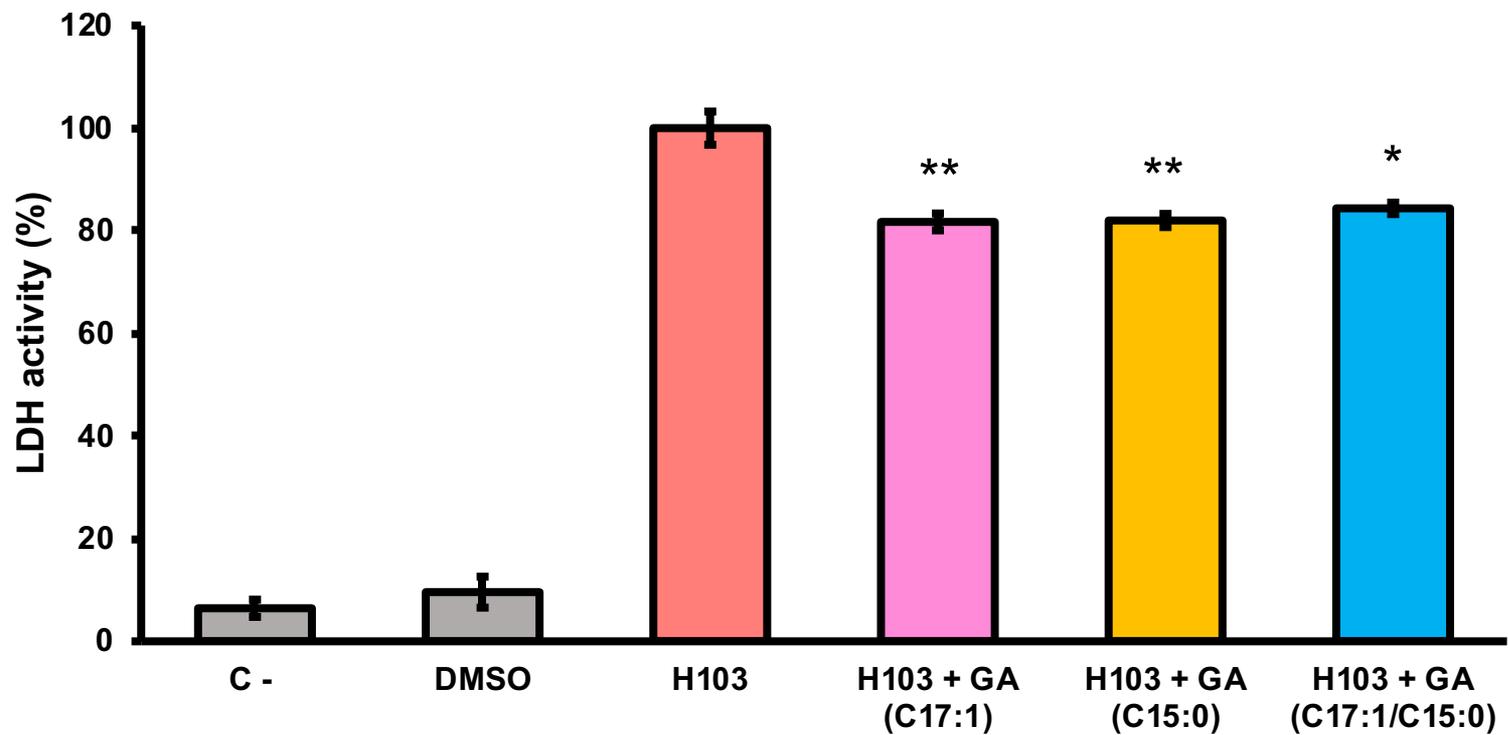
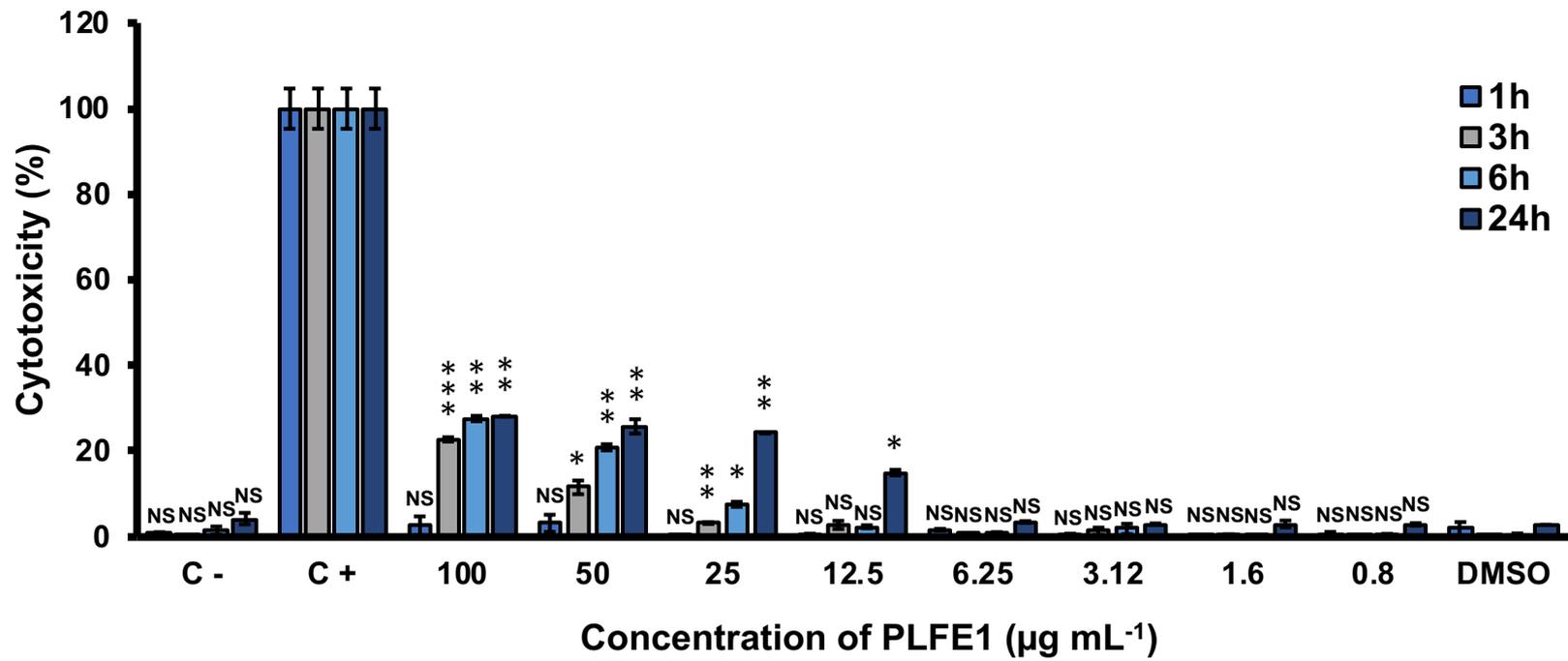
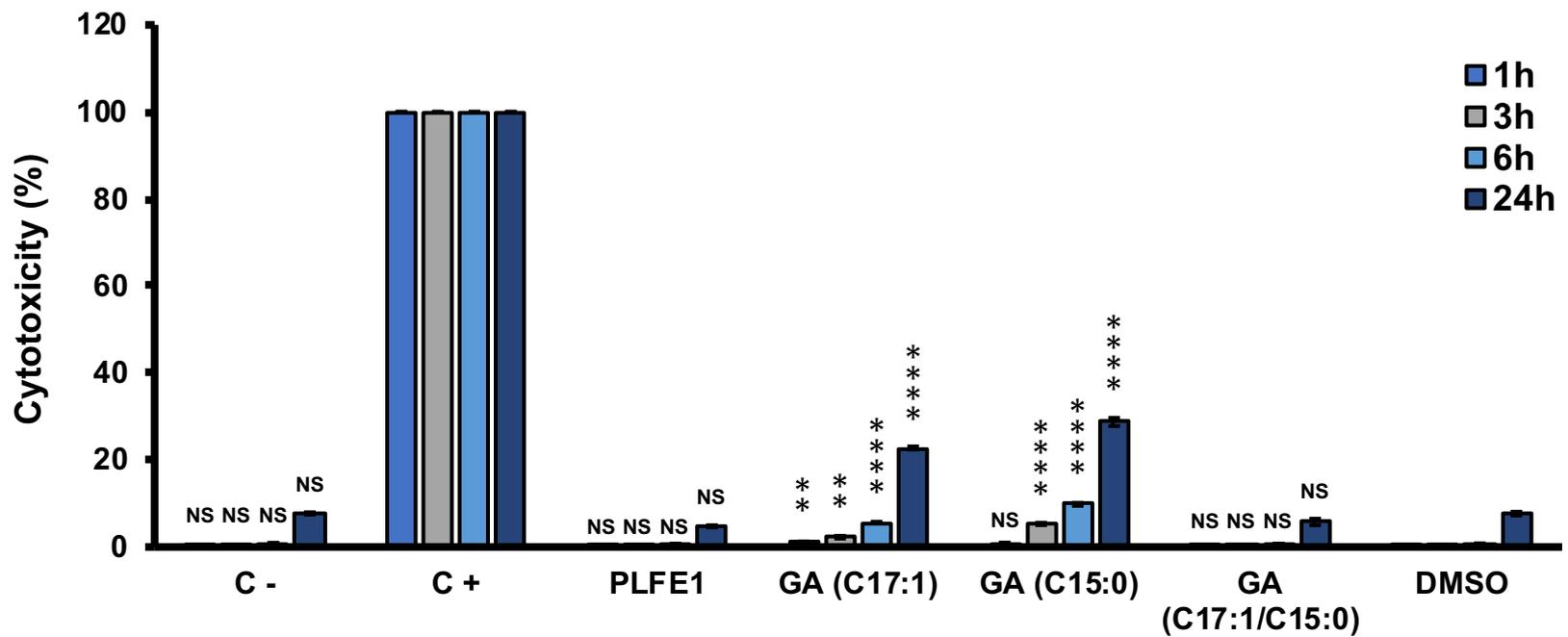


Figure 7

A



B



IV. Annexe 4. Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103

J'ai contribué à cet article sur les expériences liées au phage Pf4 et aux expériences liées au test de virulence sur le modèle *Galleria mellonella*.

OPEN

Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103

Mélyssa **Cambrone**¹, Damien **Tortuel**¹, Kelly **Biaggini**¹, Olivier **Maillot**¹, Laure **Taupin**², Karine **Réhel**², Isabelle **Rincé**³, Cécile **Muller**³, Julie **Hardouin**⁴, Marc **Feuilleley**¹, Sophie **Rodrigues**¹ & Nathalie **Connil**^{1*}

Microbial endocrinology has demonstrated for more than two decades, that eukaryotic substances (hormones, neurotransmitters, molecules of the immune system) can modulate the physiological behavior of bacteria. Among them, the hormones/neurotransmitters, epinephrine (Epi) and norepinephrine (NE), released in case of stress, physical effort or used in medical treatment, were shown to be able to modify biofilm formation in various bacterial species. In the present study, we have evaluated the effect of Epi on motility, adhesion, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium linked to many hospital-acquired infections, and responsible for chronic infection in immunocompromised patients including persons suffering from cystic fibrosis. The results showed that Epi increased adhesion and biofilm formation of *P. aeruginosa*, as well as its virulence towards the *Galleria mellonella* larvae *in vivo* model. Deciphering the sensor of this molecule in *P. aeruginosa* and the molecular mechanisms involved may help to find new strategies of treatment to fight against this bacterium.

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative opportunistic pathogen known for its implication in many hospital-acquired infections and in immunocompromised patients suffering from cystic fibrosis¹. Furthermore, it is a pathogen of concern, since it was classed as critical by the World Health Organization in 2017, due to its antibiotic resistance. The pathogenicity of this bacterium is associated with its capacity to induce chronic infections (strong biofilms, which are difficult to treat) and acute infections where many virulence factors can be secreted. *P. aeruginosa* possesses a large genome (6.3 million base pairs) including many regulatory two-component systems and transcriptional regulators which contribute to its remarkable environmental adaptability^{2,3}.

Q1 Q2 Q3 Q4

During host infection, bacteria are exposed to many eukaryotic substances such as immune system molecules (interleukin), peptides hormones (CNP, substance P) and neurotransmitters (GABA)⁴. Molecules released under host stress can influence host-pathogens interactions and bacterial pathogenicity⁵. Stress, trauma^{6,7}, physical effort and therapy utilization of inotropes leads to the presence of catecholamines in the human body, which gather three endogenous molecules: dopamine, norepinephrine (NE) and epinephrine (Epi). These substances were found to be able to modulate the growth of Gram-negative pathogens like *Escherichia coli*⁸, *Vibrio cholerae*⁹, *Helicobacter pylori*¹⁰, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*¹¹. Furthermore, some bacteria increased their virulence when exposed to catecholamines such as *Vibrio harveyi*, which was more virulent towards brine shrimp larvae, following a treatment with NE or dopamine¹². The motility and capacity to form biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 and *V. harveyi* were also found to be enhanced in presence of catecholamines^{12,13}. In *P. aeruginosa* PA14, NE modulates the virulence and motility of the bacterium, and the *las* quorum-sensing pathway may be involved in the response towards this molecule¹⁴. In another study conducted on *P. aeruginosa*, strain PAO1, the

¹Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Normandie Université – Université de Rouen, Évreux, 27000, Evreux, France. ²Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) EA 3884, IUEM, Université de Bretagne-Sud, 56100, Lorient, France. ³Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), EA 4655, UFR des sciences, Normandie Université, Université de Caen, 14000, Caen, France. ⁴Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces, UMR 6270 CNRS, Plateforme Protéomique, PISSARO, Normandie Université, Université de Rouen, 76130, Mont Saint Aignan, France. *email: nathalie.connil@univ-rouen.fr

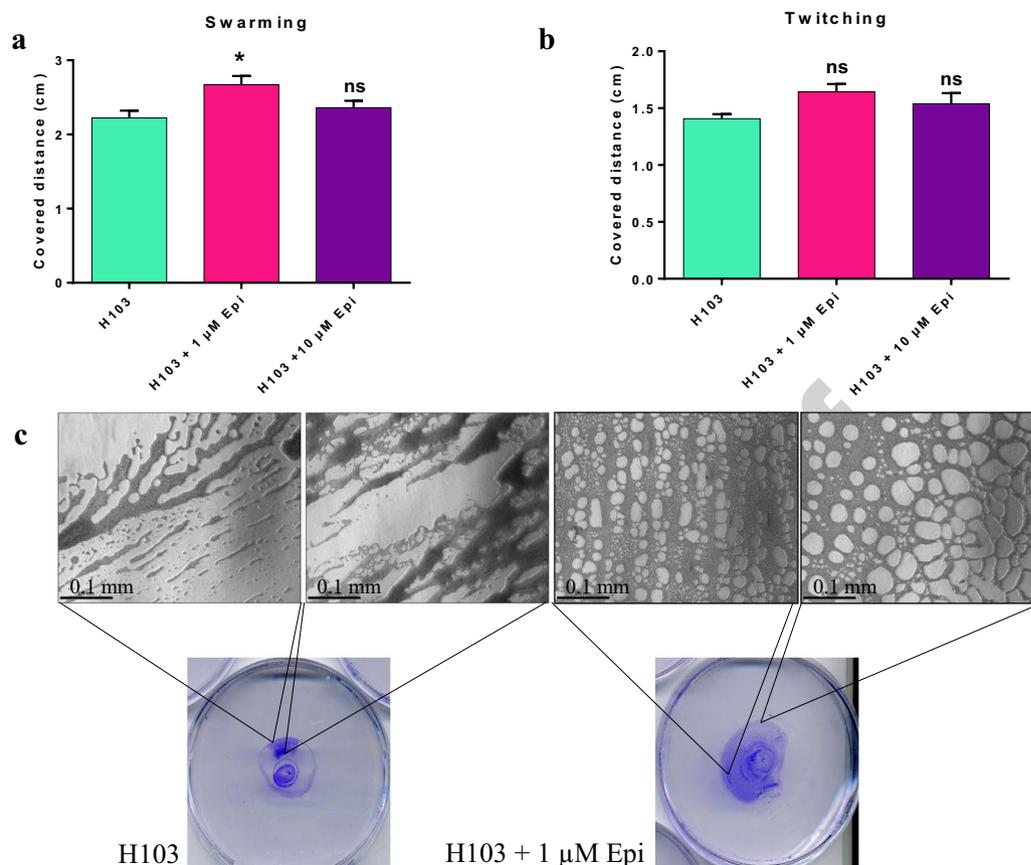


Figure 1. Effect of Epi on *P. aeruginosa* H103 motility. (a) Covered distance by swarming motility on LB 0.6% agar, after 24 h, (b) Covered distance by twitching motility on LB 1% agar, (c) Macroscopic and microscopic observations of twitching. Micrographs were taken with an Axio Vert A.1 inverted microscope, scale bar: 0.1 mm. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used, ($n = 6$ and $n = 3$ for swarming and twitching assays respectively), * $p = 0.0125$, ns: not significant.

authors showed that NE was able to repress the production of siderophore and the expression of *tox*A coding an important virulence factor exotoxin A¹⁵, rather than enhancing virulence production as seen with other bacteria.

Contrary to NE, prior to this study, very little information was available concerning the behavior of *P. aeruginosa* exposed to Epi. In this context, the aim of our study was to investigate the effect of this molecule on *P. aeruginosa* motility, adhesion, biofilm formation and virulence.

Results

Motility of *P. aeruginosa* H103. As motility was found to be modified in a large amount of Gram-negative bacteria after exposure to NE or Epi^{13,16–19}, we decided to study this effect on *P. aeruginosa* H103 (Fig. 1). The results obtained showed that the radial growth of swarming phenotype was increased in presence of 1 μ M Epi (Fig. 1a) and the twitching motility was qualitatively modulated (Fig. 1b). Indeed, the microscopic observation revealed that in presence of Epi, the twitching of *P. aeruginosa* H103 seemed to form a more well-organized network, compared to the untreated bacteria (Fig. 1c). As type IV pili can be involved in swarming and twitching of *P. aeruginosa* H103^{20,21}, we then completed this study by using PO4 phage, which effect on *P. aeruginosa* H103 is highly dependent on type IV pili.

PO4 phage sensitivity of *P. aeruginosa* H103. Bacteriophages require a specific component of bacteria for host infection, like lipopolysaccharides for the phage PaP1²² or proteins on the bacterial surface. PO4 bacteriophages bind to the type IV pili of *P. aeruginosa*. To test the hypothesis of modulation of type IV pili in presence of Epi, a double agar overlay plaque assay was carried out. The results of this experiment, presented on Fig. 2, showed that *P. aeruginosa* H103 was more sensitive to the PO4 bacteriophage in presence of Epi. Indeed, the number of lysis plaque was higher when treated with 1 and 10 μ M Epi, leading to 3.27-fold increase ± 0.5 , and 1.24 ± 0.05 , respectively. This means that when *P. aeruginosa* H103 was in contact with Epi, its sensitivity towards the PO4 phage was enhanced. This result reinforces the hypothesis that Epi may modify the type IV pili structure resulting in the modification of motility observed above.

Adhesion of *P. aeruginosa* H103. Adhesion to a surface is the first step which allows bacteria to colonize an environment and thereafter, to form biofilm. Bacteria possesses many components that help them to adhere on

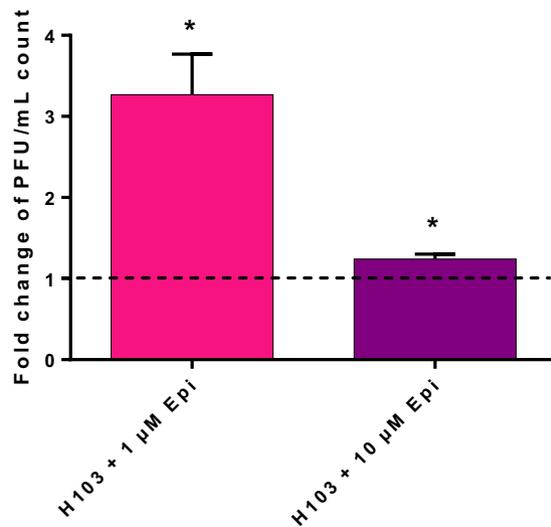


Figure 2. Effect of Epi on phage PO4 sensitivity. Phage PO4 sensitivity towards *P. aeruginosa* H103 was tested in presence of 1 and 10 μM of Epi after 24 h. Plaque lysis were enumerated and expressed in PFU/mL, fold change is expressed for each condition. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used (n = 4), **p* = 0.025.

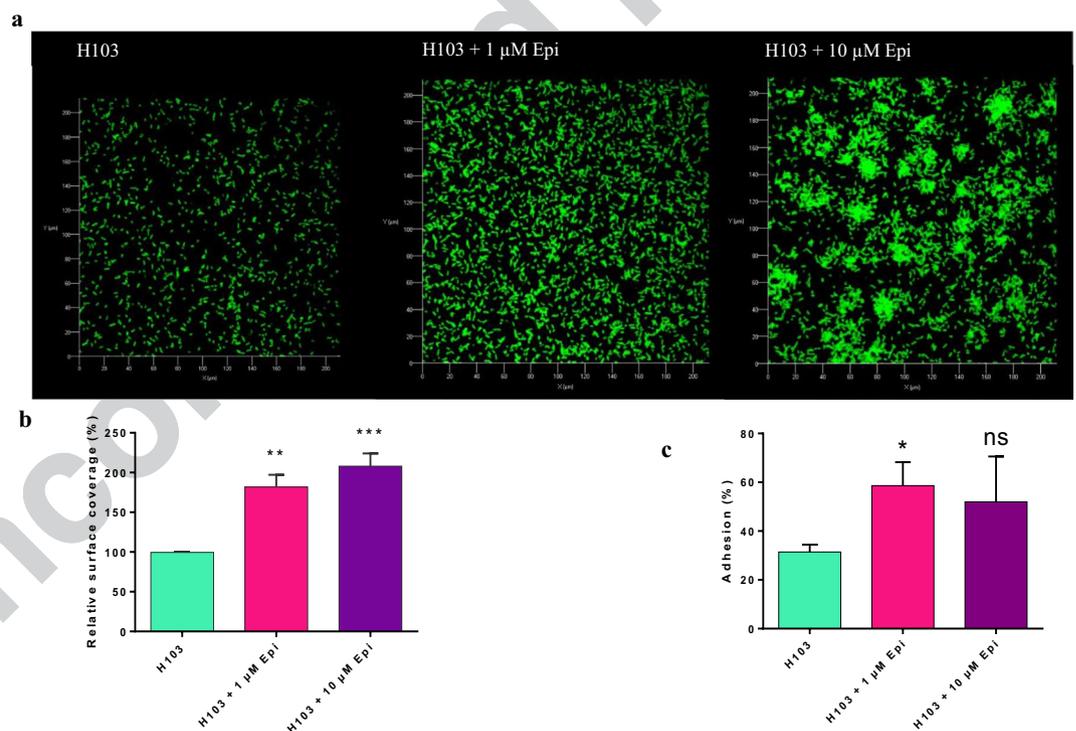


Figure 3. Effect of Epi on adhesion of *P. aeruginosa* H103. (a) Top view of *P. aeruginosa* H103-GFP adhesion observed by CLSM with two different concentrations of Epi (1 and 10 μM), after 2 h. (b) Image analysis by COMSTAT. Data were normalized according to the untreated control set at 100%. (c) Adhesion assay on Caco2/TC7 cells, **p* = 0.0418. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used (n = 5), ***p* = 0.001222, ****p* = 0.000413, ns: not significant.

surfaces, like adhesion or the type IV pili. In this work, we investigated the effect of 1 and 10 μM Epi on adhesion of *P. aeruginosa* H103 to abiotic and biotic surfaces. The results obtained are presented on Fig. 3. A COMSTAT analysis showed that *P. aeruginosa* H103 displayed an increased surface coverage (181% ± 15%) when treated with 1 μM of Epi, compared to control (Fig. 3b). A higher concentration (10 μM of Epi) also increased the covered surface of *P. aeruginosa* H103 (207% ± 16%) (Fig. 3b). Moreover, *P. aeruginosa* H103 seems to form aggregates when treated with 10 μM of Epi (Fig. 3a).

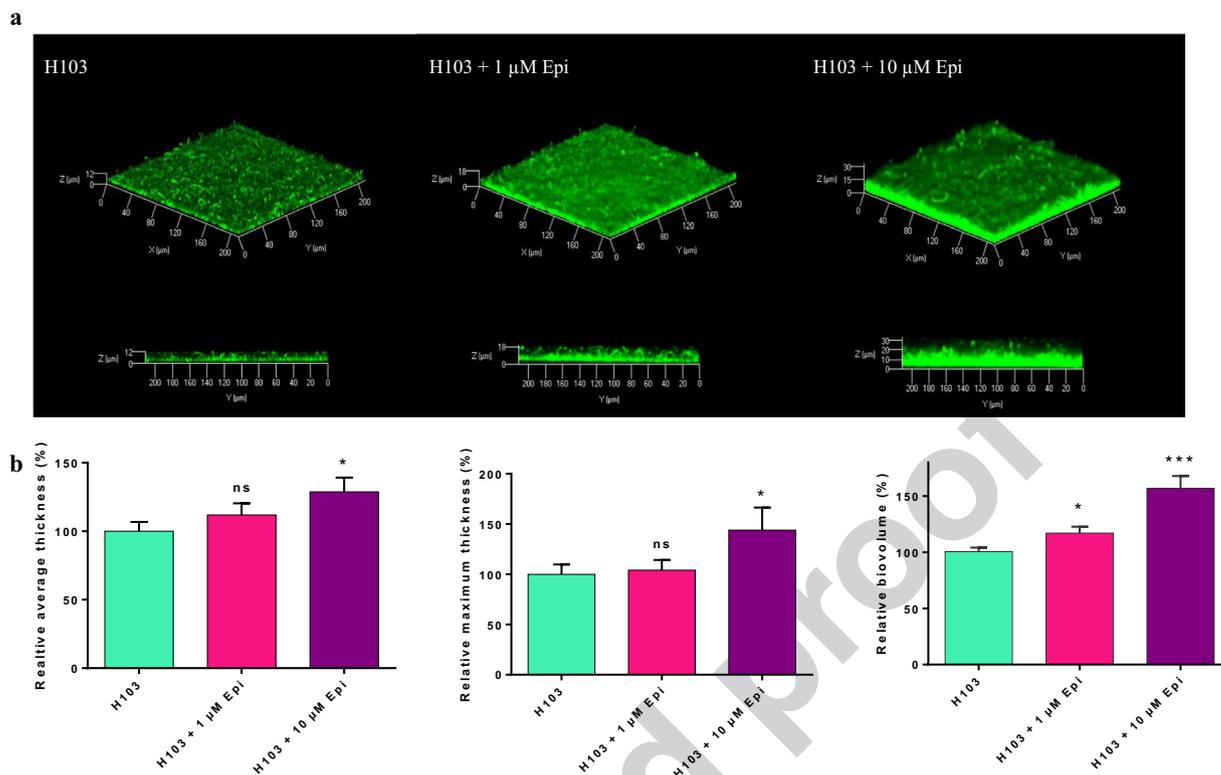


Figure 4. Effect of Epi on *P. aeruginosa* H103 biofilm formation. (a) Three dimensional (3D) and side views of *P. aeruginosa* H103-GFP 24 h biofilm observed by CLSM, in presence of 1 or 10 μ M of Epi. (b) Images analysis by COMSTAT. Data were normalized according to the untreated control set at 100%. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. Two-tailed paired *t*-test was used ($n = 4$), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns: not significant.

The capacity of *P. aeruginosa* H103 to adhere on biotic surface was then evaluated on Caco-2/TC7 cell line after 2 h of contact (Fig. 3c). The results showed that 1 μ M of Epi significantly enhanced the capacity of the bacteria to adhere to these cells ($58\% \pm 9.6\%$) compared to control ($31\% \pm 3\%$).

Biofilm formation of *P. aeruginosa* H103. A flow-cell device with glass surface was used to investigate the biofilm formation of *P. aeruginosa* H103 in dynamic conditions to mimic *in vivo* conditions (Fig. 4). For both concentrations of Epi (1 and 10 μ M) administrated continuously during biofilm formation, no modifications of biofilm architecture were observed compared to control (Fig. 4a). However, images analysis using COMSTAT software showed that average and maximum thicknesses were significantly increased in presence of 10 μ M Epi compared to untreated biofilm, with $+29\% \pm 10\%$ ($p = 0.0450$) and $+44\% \pm 22\%$ ($p = 0.0140$), respectively. No significant difference of the average and maximum thicknesses were observed with 1 μ M of Epi, but the biovolume reflecting the bacterial biomass was increased with $+18\% \pm 5.7\%$ ($p = 0.0205$) when exposed to 1 μ M of this molecule and by $+57\% \pm 11.4\%$ ($p < 0.0001$) for 10 μ M Epi (Fig. 4b).

Virulence of *P. aeruginosa* H103 towards *G. mellonella*. The pathogenicity of *P. aeruginosa* H103 treated or not with 1 or 10 μ M Epi was assessed with the *in vivo* model *G. mellonella*, which has been developed in recent years, as an alternative to murine or other vertebrate models of infection to contribute to the 3Rs (reduction, replacement, and refinement) of animal use in scientific research. The results of this experiment, presented on Fig. 5, showed that the mortality of the larvae was accelerated when bacteria were treated and co-injected with 10 μ M Epi. Indeed, only 38% of the larvae remained alive at 13 h post-infection in the 10 μ M Epi treated conditions compared to 58% of survival for infection with the pathogen alone. On the contrary, a treatment with 1 μ M Epi had no effect on pathogenicity of *P. aeruginosa* H103. A control negative was also used to be sure that Epi had no direct effect on larvae mortality.

Discussion

Bacteria can be exposed to a multitude of host cell molecules such as catecholamines⁷ that could enhance the growth of many gram-negative bacteria^{8,9,12,17,18,23–26} as well as their virulence^{19,27}. Till now, only few studies were conducted on the effect of these molecules on *P. aeruginosa*, which is an opportunistic pathogen, often found in hospital-acquired infections. Freestone and collaborators²⁸ have shown that inotropes (dopamine, Epi and NE) are able to increase the biofilm formation of *P. aeruginosa*. Hedge *et al.*¹⁴ showed that NE increases *P. aeruginosa*

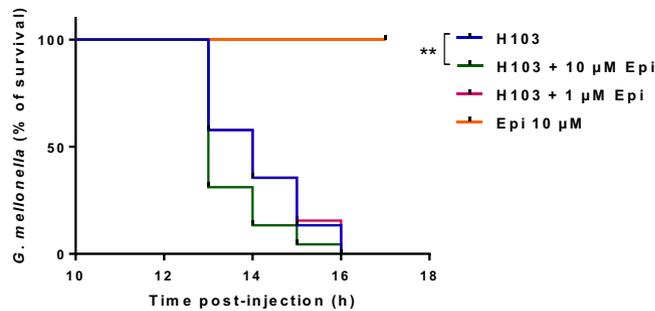


Figure 5. Virulence assay on *G. mellonella*. The virulence of *P. aeruginosa* H103 was tested towards the caterpillar *G. mellonella* larvae, during 17 h (Log-rank (Mantel-Cox) test was used, $**p = 0.0086$).

PA14 virulence through the *las* quorum-sensing pathway by inducing, among others, the expression of *lasA* and *lasB*. Li *et al.*¹⁵ demonstrated that NE decreased siderophore production and *toxA* expression.

Epi and catecholamines in general, can promote bacterial motility. In the present study, we showed that the swarming seemed to be slightly affected only at 1 µM Epi; moreover, the twitching motility displayed modifications in microscopic phenotype. In previous work, we have already observed that the swarming of *P. fluorescens* can also be affected by exposure to 1 µM Epi²⁹. Twitching motility of *P. aeruginosa* PA14 strain was increased by Epi²⁸. The present work showed that the stimulation of the twitching and the sensitivity to the PO4 bacteriophage are connected. Indeed, the PO4 phage needs the type IV pili to infect our strain³⁰, and we saw that Epi enhance the intensity of the twitching, which indirectly measure the type IV pili function³¹. Production of rhamnolipids (another structure that can be involved in motility) has been quantified (Supplementary data 1) and no differences between treated and control conditions have been observed, reinforcing the hypothesis that the effect of Epi on motility may come from the type IV pili or the flagellum.

We demonstrated that upon exposure to Epi (1 and 10 µM), *P. aeruginosa* H103 adhesion on abiotic surface was increased and a concentration of 10 µM of Epi led to bacterial cell-cell attachment and microcolony formation. Lyte *et al.* (2003) demonstrated that adhesion of *Staphylococcus epidermidis* on polystyrene and silicon was increased upon addition to catecholamines inotropes (dopamine and NE)³². These authors also found the presence of bacterial aggregates following a microscopic evaluation of the biofilm. An enhancement of a specific biofilm exopolysaccharides production was proposed as an explanation for these phenomena. Attachment to surface was studied with *P. aeruginosa* PA14 on endotracheal tubes and the presence of cell-cell attachment was described as well²⁸.

Biofilms enhance bacterial growth and survival by providing access to nutrients and provide protection from host immune system molecules and antimicrobial compounds. Furthermore, pathogenicity is often closely related to bacterial biofilm formation^{33–35}. In the present study, we have examined the biofilm formation of *P. aeruginosa* under a continuous exposure (24 h) of Epi in dynamic conditions (i.e. flow cell system). We have observed an increased biovolume or thickness in presence of 1 or 10 µM of this molecule. None of these concentrations affected the growth of *P. aeruginosa* (Supplementary data 2). Freestone and collaborators (2012) also described an increased capacity of *P. aeruginosa* to form biofilm on eukaryotic cells and on endotracheal tube²⁸ when treated with Epi on serum-SAPI medium, which mimics more closely the *in vivo* conditions. Other authors also showed an increase of biofilm formation when treated with catecholamines inotropes^{12,13,32,36}.

The mechanism by which Epi could increase biofilm formation remains unclear. We can hypothesize that the impact of Epi on the type IV pili could contribute to the increase of adhesion and then biofilm formation. The type IV pili plays an important role in the establishment of bacterial adhesion on abiotic surface (twitching motility) as well as in the development of microcolony and is required for biofilm formation by *P. aeruginosa*^{37–40}.

The increasing ability of *P. aeruginosa* H103 to form biofilm when exposed to Epi suggested a role of this stress hormone in virulence. In our case, Epi at 10 µM significantly increased *P. aeruginosa* virulence towards *G. mellonella*. Similarly, Yang *et al.*, (2014) demonstrated that catecholamines could enhance the virulence of pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi*) towards a gnotobiotic brine shrimp larvae model¹². Other authors studied the virulence of *Vibrio campbellii* BB120 toward giant freshwater prawn larvae, and showed that NE and dopamine were able to modulate the virulence of this bacterium¹⁷. In the prawn larvae model, the virulence can be increased by the production of extracellular protease⁴¹ and by the utilization of the type III secretion system⁴².

The interaction between bacteria and the host depends on their capacity to communicate. The production of catecholamines, which can occur after a trauma, stress or a physical effort, influences the bacterial pathogenicity⁶. Bacteria have adapted to their environment by developing various mechanisms, and two-component system is one of them. In *E. coli* O157:H7, two different systems, QseC/QseB and QseE/QseF have been described for their implication in sensing the presence of Epi or NE^{43–45}. Other alternative adrenergic receptors have been found in organisms such as *S. Typhimurium* (BasS/R) or in *S. enterica* serovar Typhi⁴⁶ (CpxA/R). To our knowledge, no adrenergic sensors have been identified in *P. aeruginosa* up to now. Investigations regarding the presence of homologous sequences to QseC in *P. aeruginosa* H103 have been performed in our laboratory. Some putative catecholamines receptors are now considered for further research. Deciphering the mechanism by which pathogenic bacteria are able to respond to host stress hormones could help understand how the signal is perceived and transduced, and the pathways impacted by these molecules. Proteomic analysis of *P. aeruginosa* H103 treated with Epi will also help us to discover how Epi acts on bacteria. *P. aeruginosa* can be present and responsible for skin,

lung or intestine infections, where many eukaryotic substances are secreted; it is necessary to develop a way to prevent these phenomena to happen. Finding new therapeutic strategies could help to block bacterial capacity to perceive these eukaryotic signals and may reduce virulence.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. The bacteria used in this study were *P. aeruginosa* H103 (PAO1 derivative strain)⁴⁷ and the H103-GFP strain tagged with the green fluorescent protein (GFP)-encoding pHHC60 plasmid (*gfp*, *tet^R*)⁴⁸. They were routinely grown at 37 °C under a rotary shaker (180 rpm) in Luria Bertani (LB) medium (containing 5 g/L NaCl). Depending on the assay, cultures were exposed to Epi (Sigma-Aldrich) from 1 to 10 µM. Tetracycline was used at 125 µg/mL for the culture of H103-GFP strain.

Motility assays. Swarming and twitching motility were tested on LB with 0.6% and 1% (w/v) agar, respectively, and containing 1 µM or 10 µM as previously described^{49,50}. Swarming plates were inoculated using a bacterial suspension spotted on the surface and incubated for 24 h at 37 °C. For twitching assay, the suspension was spotted underneath the agar layer. After 24 h at 37 °C, agar was removed, and cells attached to the Petri dish bottom were stained with crystal violet 0.4%. Micrographs were taken using a Zeiss Axio Vert A.1 inverted microscope (x40) (Zeiss, Germany) with a QImaging QIClick camera and Q-capture pro 7 software (QImaging, Canada). For both motility assays, each experiment was conducted three times with at least three biological replicates by test.

PO4 phage sensitivity assay. Sensitivity of PO4 bacteriophage towards *P. aeruginosa* H103 was tested in 1.5% LB agar plate, with or without Epi. The double agar overlay method was used for the first step of phage isolation and later for precise titration of phage suspension⁵¹. Dilutions of phage suspension were mixed with 100 µl of *P. aeruginosa* H103 (10⁸ CFU/mL) in molted agar (supplemented or not with 1 µM or 10 µM Epi) and then poured on the top of LB agar plate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Lysis plaques were then counted, and results were expressed in PFU/mL. Data were obtained from four independent experiments.

Biofilm culture. Biofilms grown under hydrodynamic conditions were performed in a three channel flow cell (1 × 40 × 44 mm; Biocentrum, DTU, Denmark)⁵². The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg⁵³. The substratum consisted of a microscope glass coverslip (24 × 50 st1 [Knittel Glasser, Germany]). Each channel was inoculated with 250 µl of an overnight culture of *P. aeruginosa* H103 diluted to an OD₅₈₀ of 0.1 (10⁸ CFU/mL) in physiological water (NaCl 0.9%). A two-hour attachment step was performed without any flow. A flow (2.5 mL/h) of LB medium with or without Epi (1 and 10 µM) was then applied for 24 h using a Watson Marlow 205U peristaltic pump (Watson Marlow, UK). The attached bacteria or biofilms were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) as described below.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Biofilm observations were performed with a Zeiss LSM710 (Zeiss, Germany) using a 40x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring the GFP fluorescence. GFP was excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of three-dimensional (3D) image data, the Zen 2.1 software (Zeiss, Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks were performed using the COMSTAT software (<http://www.imageanalysis.dk/>)⁵⁴. For bacterial adhesion, the percentage of covered surface was determined using ImageJ software⁵⁵. At least three image stacks from each of three independent experiments (nine stacks in total) were used for each analysis.

Galleria mellonella virulence assay. *P. aeruginosa* H103 strain, used for infection of *G. mellonella*, were grown in LB supplemented with 1 or 10 µM Epi, for 6 h (late exponential phase). After centrifugation, bacterial cells were washed once in physiological water (NaCl 0.9%) and resuspended to a final concentration of 10⁵ CFU/mL. The size of the inoculum was confirmed by numeration on solid LB. Fifteen larvae were infected with 10 µL of a cell suspension, supplemented or not with Epi, into the hemocoel using a microinjector (KDS100 Legacy, Fisher Scientific) with a sterilized microsyringe^{56,57}. Larva were incubated at 37 °C and survival was monitored during 17 h post-infections.

Cells cultures. The human colon adenocarcinoma Caco-2/TC7 cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 15% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin (100 µg/mL). Cells were cultivated at 37 °C, in 5% CO₂ - 95% air atmosphere and the medium was regularly changed. For adhesion assays, cells were seeded in 24 wells plates treated for tissue culture and used at confluence.

Adhesion. Adhesion of *P. aeruginosa* H103 on intestinal Caco-2/TC7 cells was investigated according to Baccouri *et al.*⁵⁶ including some modifications. Bacteria were grown for 6 h in LB supplemented with 1 or 10 µM Epi (late exponential phase), then collected by centrifugation at 8000 × g for 10 min. The pellets were resuspended in DMEM without FBS and antibiotics, added on the confluent intestinal cells at a MOI of 100 bacteria per cell, and allowed to adhere. After 2 h of adhesion, Caco-2/TC7 cells were washed twice with PBS (Phosphate Buffer Saline) to remove planktonic bacteria, and then disrupted with 0.1% triton 100x. The lysates were then diluted and plated on LB agar, to determine the number of adherent bacteria.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.1.2; GraphPad Software, San Diego, California, USA). For the *G. mellonella* killing assay, larvae survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and survival differences were tested for significance using the log rank test. In

all other assays, *t*-test were used to compare the means within the same set of experiments. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

Received: 6 August 2019; Accepted: 4 December 2019;

Published: xx xx xxxx

References

- Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* **56**, 309–322 (2005).
- Chevalier, S. *et al.* Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1862**, 706–721 (2019).
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V. & Foglino, M. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **8**, 498–504 (2000).
- Lesouhaitier, O. *et al.* Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors (Basel)*. **9**, (6967–90 (2009).
- Freestone, P. P. E., Sandrini, S. M., Haigh, R. D. & Lyte, M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol.* **16**, 55–64 (2008).
- Crum, R., Borrow, B., Shackford, S., Hansbrough, J. & Brown, M. R. The neurohumoral response to burn injury in patient resuscitated with hypertonic saline. *J. Trauma* **28**, 1181–7 (1988).
- Udupa, K. N. The neurohumoral response to trauma. *Am. J. Surg.* **135**, 403–405 (1978).
- Lyte, M. & Ernst, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci.* **50**, 203–212 (1992).
- Halang, P. *et al.* Response of *Vibrio cholerae* to the Catecholamine Hormones. *J. Bacteriol.* **197**, 3769–3778 (2015).
- Doherty, N. C., Tobias, A., Watson, S. & Atherton, J. C. The Effect of the human gut-signalling hormone, norepinephrine, on the growth of the gastric pathogen helicobacter pylori. *Helicobacter* **14**, 223–230 (2009).
- Freestone, P. P. E., Haigh, R. D. & Lyte, M. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiol.* **7**, 1–13 (2007).
- Yang, Q., Anh, N. D. Q., Bossier, P. & Defoirdt, T. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Front. Microbiol.* **5**, 1–12 (2014).
- Bansal, T. *et al.* Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. *Infect. Immun.* **75**, 4597–4607 (2007).
- Hegde, M., Wood, T. K. & Jayaraman, A. The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 763–776 (2009).
- Li, W. *et al.* Norepinephrine represses the expression of *toxA* and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 3831–3840 (2009).
- Bearson, B. L. & Bearson, S. M. D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **44**, 271–278 (2008).
- Pande, G. S. J., Suong, N. T., Bossier, P. & Defoirdt, T. The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**, 761–769 (2014).
- Intaraj, N., Muangsombut, V., Stevens, M. P., Korbsrisate, S. & Vattanaviboon, P. Growth, motility and resistance to oxidative stress of the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* are enhanced by epinephrine. *Pathog. Dis.* **72**, 24–31 (2014).
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifyazdi, H. & Bossier, P. Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation in rainbow trout. *J. Fish Dis.* **42**, 477–487 (2019).
- Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 493–520 (2012).
- Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P. & Persat, A. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nat. Microbiol.* **4**, 774–780 (2019).
- Li, G. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to phage PaP1 predation via O-antigen polymerase mutation. *Front. Microbiol.* **9**, 1–10 (2018).
- Nakano, M. *et al.* Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 649–653 (2007).
- Freestone, P. P., Haigh, R. D., Williams, P. H. & Lyte, M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 53–60 (1999).
- Williams, P. H. *et al.* Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 296–303 (2003).
- Li, L. *et al.* Catecholamines Promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* Growth by Regulating Iron Metabolism. *PLoS One* **10**, e0121887 (2015).
- Gao, J. *et al.* The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiologyopen* **8** (2019).
- Freestone, P. P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* –Catecholamine Inotrope Interactions. *Chest* **142**, 1200–1210 (2012).
- Biaggini, K. *et al.* The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch. Microbiol.* **3**, 983–990 (2015).
- Bradley, D. E. Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. *J. Virol.* **12**, 1139–48 (1973).
- McCutcheon, J. G., Peters, D. L. & Dennis, J. J. Identification and characterization of type IV Pili as the cellular receptor of broad host range *Stenotrophomonas maltophilia* bacteriophages DLP1 and DLP2. *Viruses* **10**, E338 (2018).
- Lyte, M. *et al.* Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* **361**, 130–135 (2003).
- Parsek, M. R. & Singh, P. K. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003).
- Hassett, D. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 117–130 (2010).
- Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* **121**, 1–58 (2013).
- Sandrini, S., Alghofaili, F., Freestone, P. & Yesilkaya, H. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. *BMC Microbiol.* **14**, 1–12 (2014).
- Klausen, M. *et al.* Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**, 1511–1524 (2003).
- O’Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998).
- Jenkins, A. T. A., Buckling, A., McGhee, M. & French-Constant, R. H. Surface plasmon resonance shows that type IV pili are important in surface attachment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. R. Soc. Interface* **2**, 255–259 (2005).
- Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 363–378 (2004).

41. Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A. & Cytryńska, M. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **115**, 14–25 (2014).
42. Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. & Drenkard, E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71**, 2404–13 (2003).
43. Zhu, C., Sperandio, V., Boedecker, E. C., Hughes, D. T. & Clarke, M. B. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10420–10425 (2006).
44. Rasko, D. A. *et al.* Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. *Science* **321**, 1078–1080 (2008).
45. Reading, N. C. *et al.* A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.01848-06> (2007).
46. Karavolos, M. H., Winzer, K., Williams, P. & Khan, C. M. A. Pathogen espionage: Multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. *Mol. Microbiol.* **87**, 455–465 (2013).
47. Hancock, R. E. & Carey, A. M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140**, 902–10 (1979).
48. Cheng, H. P. & Walker, G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**, 5183–91 (1998).
49. Turnbull, L. & Whitchurch, C. B. Motility assay: twitching motility. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 73–86 (2014).
50. Ha, D.-G., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 67–72 (2014).
51. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. & Johnson, R. P. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods Mol. Biol.* **501**, 69–76, https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7 (Humana Press, 2009).
52. Pamp, S. J., Sternberg, C. & Tolker-Nielsen, T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytom. Part A* **75A**, 90–103 (2009).
53. Tolker-Nielsen, T. & Sternberg, C. Growing and Analyzing Biofilms in Flow Chambers. *Curr. Protoc. Microbiol.* **21**, 1B.2.1–1B.2.17 (2011).
54. Heydorn, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**, 2395–2407 (2015).
55. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
56. Baccouri, O. *et al.* Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. *Front. Microbiol.* **10**, 881 (2019).
57. Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R. H. & Quax, W. J. Assessing *Pseudomonas* Virulence with Nonmammalian Host: *Galleria mellonella*. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 681–688, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_52 (Humana Press, New York, NY, 2014).

Acknowledgements

We wish to thank Rikki Knowlton, native English speaker for editing our manuscript. Mélyssa Cambrnel was recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research (MRT). This work was supported by grants from the Evreux Portes de Normandie Agglomeration, the Région Normandie and European Union (FEDER).

Author contributions

S.R., J.H., M.F., N.C., conceived and designed the experiments. M.C., S.R. and N.C. carried out most of the experiments and analyzed the data. M.C. realized and analyzed bacterial motility experiments. M.C. and D.T. performed phage experiments. S.R. helped for adhesion and biofilm experiments with flow-cell device. M.C., K.B., N.C. performed adhesion on eukaryotic cells. M.C., S.R., L.T. and K.R. extracted and analyzed rhamnolipids. I.R., C.M., M.C., S.R. and D.T. performed the virulence test on *G. mellonella* model. O.M. contributed to technical assistance. M.C., S.R. and N.C. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56666-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.C.

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

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



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

© The Author(s) 2019

V. Annexe 5. *Curriculum vitæ* et liste des communications.



Damien TORTUEL

6 rue Pierre Semard
27000 Evreux

Né le 01/02/1993
25 ans

Permis B



06 69 47 13 33



damien.tortuel@gmail.com



<https://www.linkedin.com/in/damien-tortuel-036415145>



<https://orcid.org/0000-0003-0621-6198>

Expérience professionnelle

Octobre 2019 – Août 2020 • Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement (Evreux, Eure) • A.T.E.R Section 65.

Octobre 2016 – Septembre 2019 • Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement (Evreux, Eure) • Doctorant en Microbiologie

- Sujet de thèse : « Caractérisation d'un nouveau système récepteur-transducteur de signaux impliqué dans la formation de biofilm et la virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* »
- Gestion d'un projet de recherche (Budget, choix des techniques utilisées, communication orale ou affichée (réunions, congrès...))
- Autonomie, gestion du temps, travail en équipe, démarche scientifique

Janvier 2016 – Juin 2016 • Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement (Evreux, Eure) • Stagiaire en Microbiologie (Master 2)

- Sujet de stage : « Etude de la régulation transcriptionnelle d'un facteur sigma à fonction extra-cytoplasmique chez *Pseudomonas aeruginosa* : construction d'une banque de mutants par transposition aléatoire »

Avril 2015 – Juillet 2015 • Unité de recherche Risques Microbiens – Equipe Antibiorésistance (Caen, Calvados) • Stagiaire en Microbiologie (Master 1)

- Sujet de stage : « Etude du mécanisme de résistance à la vancomycine chez *Microbacterium resistens* »

Formation

2016 - 2019 • Doctorat en Microbiologie • Normandie Université

2014 - 2016 • Master Biosciences Spécialité Microbiologie • Université de Caen (Caen, Calvados)

2012 - 2014 • Licence de Biologie Parcours Microbiologie • Université de Caen (Caen, Calvados)

2010 - 2012 • DUT Génie Biologie – Option Analyses Biologiques et Biochimiques • Université de Rouen (IUT d'Evreux, Eure)

2007 - 2010 • Baccalauréat Scientifique – Option Sciences de la Vie et de la Terre • Lycée Rotrou (Dreux, Eure-Et-Loir)

Centres d'intérêt

Météorologie

Phénomènes extrêmes (orages, tornades...)

Cinéma

Science-Fiction, Fantastique, Action, Thriller, Comédie

Jeux vidéo

Aventure, Action, Tir, Stratégie...

Musique

Eclectique, préférence pour les musiques électroniques

Lecture

Science-fiction, fantastique, classique



Damien TORTUEL

6 rue Pierre Semard
27000 Evreux

Né le 01/02/1993
25 ans

Permis B



06 69 47 13 33



damien.tortuel@gmail.com



<https://www.linkedin.com/in/damien-tortuel-036415145>



<https://orcid.org/0000-0003-0621-6198>

Compétences techniques



Techniques de Microbiologie

- Mise en culture de bactéries Gram + et Gram - (liquide, solide...)
- Mobilités bactériennes
- Adhésion bactérienne
- Formation de biofilm
- Mise en culture de bactériophages
- Dosage de facteurs de virulence
- Test de virulence sur *Caenorhabditis elegans*

Techniques de Biologie Moléculaire

- Extraction d'acides nucléiques (ADN, plasmides, ARN)
- PCR
- PCR quantitative en temps réel
- Mutagenèse aléatoire par transposition
- Clonage

Techniques de Microscopie

- Microscopie optique
- Microscopie à épifluorescence
- Microscopie confocale à balayage laser

Techniques de Biochimie

- Extraction protéique
- Electrophorèse uni ou bi-dimensionnelle

Techniques de Biologie Cellulaire

- Passage de cellules
- Test de cytotoxicité par dosage LDH

Autres compétences



Anglais

Informatique

Pack office, CLC Genomics Workbench, base de données (Pubmed, NCBI, STRING...)

Pédagogique

*Encadrement de stagiaires (Licence 3, Master 2)
Enseignement (Biochimie, Biologie Moléculaire, Protéomique)*

Vulgarisation scientifique

Organisation de la fête de la science pour le Laboratoire de Microbiologie – Signaux et Microenvironnement lors de l'édition 2017 (Conception de posters vulgarisés et d'activités ludiques pour enfants)



Damien TORTUEL

6 rue Pierre Semard
27000 Evreux

Né le 01/02/1993
25 ans

Permis B



06 69 47 13 33



damien.tortuel@gmail.com



<https://www.linkedin.com/in/damien-tortuel-036415145>



<https://orcid.org/0000-0003-0621-6198>

Valorisation scientifique



Articles publiés

- Cambronel M, **Tortuel D.**, et al. « Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103 ». Scientific Reports (in press, 2019).
- Tahrioui A, Duchesne R, Bouffartigues E, Rodrigues S, Maillot O, **Tortuel D.**, et al. « Extracellular release, quorum sensing and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation ». npj Biofilm and Microbiomes 5, 15 (2019).
- Flécharde M, Duchesne R, Tahrioui A, Bouffartigues E, Depayras S, Hardouin J, Lagy C, Maillot O, **Tortuel D.**, et al. « The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa* ». Scientific Reports vol. 8, 17212 (2018).
- Chevalier S, Bouffartigues E, Bazire A, Tahrioui A, Duchesne R, **Tortuel D.**, et al. « Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa* ». Biochim Biophys Acta (2018).

Communication



Orales

- **Tortuel D.**, Tahrioui A., Rodrigues S., Maillot O., Azuama O., Lesouhaitier O., Clamens T., Taupin L., Dufour A., Feuilleley M., Orange N., Cornelis P., Chevalier S., Bouffartigues E. "Pf4 phages infection induced cell envelope stress response in *Pseudomonas aeruginosa*." 8th FEMS Congress, Glasgow, Ecosse, Royaume-Uni, 7-11 juillet 2019.
- **Tortuel D.**, Tahrioui A., Azuama Co., Rodrigues S., Clamens T., Lesouhaitier O., Maillot O., Taupin L., Dufour A., Feuilleley M., Orange N., Cornelis P., Chevalier S., Bouffartigues E. "Relationships between Pf4 phage, biofilm and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Congrès Société Française de Microbiologie 2018, 1 au 3 Octobre 2018, Paris.
- **Tortuel D.**, Tahrioui A., Maillot O., Feuilleley M., Orange N., Chevalier S., Bouffartigues E. "What is the link between the expression of Pf4 phage and the ECF Sigma Factor SigX ?" 21^{ème} journée de l'école doctorale EdNBISE, Rouen, France, 22-23 mars 2018.
- **Tortuel D.**, Tahrioui A., Maillot O., Feuilleley M., Orange N., Chevalier S., Bouffartigues E. "Is Pf4 phage involved in increase expression of sigX ?" Congrès Société Française de Microbiologie 2017, 09 au 11 Octobre 2017, Paris.

Affichées

- Bouffartigues E., **Tortuel D.**, Maillot O., Dubot V., Lesouhaitier O., Orange N., Feuilleley M.G.J., Cornelis P., Chevalier S. "New insights into the molecular mechanisms regulating SigX activity in *Pseudomonas aeruginosa*." 16th international conference on Pseudomonas, Liverpool, Royaume-Uni, 5-9 Septembre 2018.
- Bouffartigues E., **Tortuel D.**, Duchesne R., Tahrioui A., Flecharde M., Gicquel G., Maillot O., Lesouhaitier O., Orange N., Feuilleley M., Cornelis P., Chevalier S. "Cell wall stress response in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the ECF sigma factor SigX." 16th international conference on Pseudomonas. Liverpool, Royaume-Uni, 5-9 Septembre 2018.
- Bouffartigues E., Si Hadj Mohand I., **Tortuel D.**, Maillot O., Binjie X., Bazire A., Dufour A., Wozniak D.J., Orange N., Feuilleley M., Cornelis P., Chevalier S. "Members of the CmaX-CfrX-CmpX operon are differently regulated by AlgU and SigX in response to heat and cold shocks in *Pseudomonas aeruginosa*." 7th FEMS Congress of European Microbiologists. Valencia, Espagne, 9-13 Juillet 2017.
- **Tortuel D.**, Bouffartigues E., Maillot O., Orange N., Feuilleley M., Chevalier S. "Development of a strategy to identify new transcriptional regulators of the extracytoplasmic function sigma factor SigX in *Pseudomonas aeruginosa*." 20^{ème} journée de l'école doctorale EdNBISE, Le Havre, France, 26-27 mars 2017.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste très résistant, pour lequel il est critique