



HAL
open science

Caractérisation du système BAC : vers l'hypothèse d'un système Psp original chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Lisa Wallart

► To cite this version:

Lisa Wallart. Caractérisation du système BAC : vers l'hypothèse d'un système Psp original chez *Pseudomonas aeruginosa*.. Chimie organique. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR119 . tel-04580956

HAL Id: tel-04580956

<https://theses.hal.science/tel-04580956>

Submitted on 21 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Caractérisation du système BAC : vers l'hypothèse d'un système Psp original chez Pseudomonas aeruginosa.

Présentée et soutenue par
LISA WALLART

**Thèse soutenue le 19/12/2023
devant le jury composé de**

MME CHRISTINE CARAPITO	Directeur de Recherche, UNIVERSITE STRASBOURG	Rapporteur du jury
M. SEBASTIEN VILAIN	Professeur des Universités, ENS COGNITIVE BORDEAUX INST POLYTECHNIQUE BORDEAUX	Rapporteur du jury
MME ISABELLE BROUTIN	Directeur de Recherche, UNIVERSITE PARIS CITE	Membre du jury
M. THIERRY JOUENNE	Directeur de Recherche, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME SYLVIE LAURENCY	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. PASCAL COSETTE	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par PASCAL COSETTE (Polymères, biopolymères, surfaces)

C'est avec ces remerciements que je clôture ces trois incroyables années de thèse. Réaliser une thèse, c'est faire un énorme pas vers l'inconnue mais, je n'ai jamais été seule dans cette aventure. Alors sachez d'avance qu'aucun mot ne sera à la hauteur de toute la gratitude et la profonde reconnaissance que j'ai envers vous tous, collègues, amis et famille.

Je souhaite avant tout remercier les membres du jury d'avoir porté attention à ce travail. Merci à vous d'avoir pris le temps de me lire et d'avoir apporté votre regard critique sur ces travaux. Je remercie les rapporteurs, le Dr. Christine Carapito, Directrice de recherche à l'IPHC de l'Université de Strasbourg et le Professeur des Universités Sébastien Vilain de l'Institut Polytechnique de Bordeaux.

Merci au Dr. Isabelle Broutin, Directrice de recherche au laboratoire CiTCoM de l'Université Paris Cité et au Professeur des Universités Sylvie Laurency de l'Université de Rouen Normandie de participer à ce jury en tant qu'examinatrices.

Je tiens à remercier une nouvelle fois le Dr. Isabelle Broutin, avec qui nous avons collaboré sur les travaux de BacA. Merci encore pour le travail que vous avez fourni sur l'article, pour votre réactivité et votre disponibilité.

J'adresse aussi mes chaleureux remerciements au Dr. Thierry Jouenne, Directeur de recherche au laboratoire PBS à Mont-Saint-Aignan pour avoir accepté de participer à ce jury mais aussi pour son œil toujours avisé sur mes travaux et ses nombreux conseils lors de la rédaction.

Je remercie la région Normandie et l'Université de Rouen Normandie d'avoir financé cette thèse.

Un grand merci au directeur du laboratoire PBS, le professeur Pascal Cosette, mais aussi le directeur de cette thèse. Merci de m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse, pour tes conseils, pour nos discussions autour de la spectrométrie de masse qui m'ont fait progresser et surtout pour la confiance que tu m'as accordé durant ces trois années de thèse. (Merci aussi pour ce fou rire interminable que tu as engendré avec ton dessin de « Fish and chips »).

J'adresse quelques lignes à l'attention de mes anciens professeurs de l'IUT d'Évreux, en particulier le Pr. Sylvie Laurency, Emeline Bouffartigues et Annabelle Merieau, toutes deux Maîtres de conférences, pour m'avoir transmis la passion des bactéries. Merci à l'enthousiaste Pr. Olivier Lesouhaitier de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche lors de mes stages de master. Je le remercie aussi d'avoir été mon enseignant référent pendant ces trois années de thèse.

Merci au Dr. Ali Tahrioui du LMSM pour son accompagnement durant les manips d'anisotropie et au Dr. Stéphane Alexandre d'avoir prit le temps de regarder ma lame d'AFM.

J'exprime mes plus profonds remerciements à l'ensemble des mes collègues, passés et présents. J'ai eu une chance incroyable de faire partie d'une équipe aussi bienveillante, soudée mais surtout extrêmement drôle (mes nombreux fou rire sur le temps du midi ne se comptent plus).

Merci au Pr. Emmanuelle Dé pour m'avoir accueillie dans son équipe, au Dr. Laurent Coquet pour sa disponibilité et son accompagnement sans faille lors des manip sur les rhamnolipides, le Dr. Hung pour m'avoir appris à dompter le microscope confocale, merci aussi pour l'intérêt et la motivation que tu as apporté durant ces derniers mois de rédaction. Merci au Dr. secouriste en bio-informatique Nicolas Nalpas pour ton aide sur les logiciels de bio-info et au Dr. Sébastien Massier, « la boîte à outils » du labo.

Un grand merci à la bienveillante Dr. Annick Schaumann, pour son implication dans les commandes et les devis qui nous permettent de ne jamais manquer de rien. J'ai profondément apprécié nos discussions, toi avec ton thé et moi avec mon café. Nous n'avons pas encore tiré les prénoms pour le secret santa mais peut être que je re-piocherais ton prénom pour la troisième année consécutive ! Ton départ à la retraite approche donc je ne peux que te souhaiter le meilleur !

Un merci tout particulier à la Dr. (H ! D ! R !, il faut crier chaque lettre) Julie Hardouin, avec qui les conversations sont si naturelles. Tu es quelqu'un remplie de bienveillance, d'humour, de gentillesse et surtout d'idées quand il s'agit de faire des bêtises. Je pense aux nombreuses décorations de bureaux auxquelles chaque personne a eu droit à son retour de congés ou de congrès et surtout auxquelles j'ai pris plaisir à participer ! Merci pour ton écoute, ton aide et nos nombreuses discussions.

Un grand merci aussi aux Dr. Salomé Sauvage et Brandon Robin, et à Delphine Vergoz, (la future Dr.), pour m'avoir accueillie chaleureusement dans votre bureau quelques mois après mon arrivée. C'était un plaisir de vous avoir auprès de moi pour discuter manip, réfléchir aux difficultés de chacun ou simplement écrire des bêtises sur le tableau (non sans l'aide d'une certaine Julie). Ce bureau est maintenant le bureau des « girls » avec l'arrivée de Lisa (une ne suffisait pas), que j'aime appeler la Bremard et de Solenn. Je vous souhaite de vivre autant de bons moments, comme j'ai pu les vivre, que ce soient des moments de doutes ou de remise en question qui font finalement grandir et des moments de rigolade et de joie qui font du bien au cerveau.

Merci à tous pour la formidable ambiance et l'atmosphère sereine que vous mettez au sein du labo.

Je souhaite remercier la douce Delphine. Merci pour tes conseils microbio et surtout merci pour ton écoute perpétuelle. Merci aussi d'avoir fait renaître ma passion pour l'équitation que j'avais mise de côté ces dernières années, grâce à ta jument Mélange. Merci pour toute la

confiance que tu m'as accordé alors que je partais de loin. Tu es maintenant sur la dernière ligne droite pour ta thèse et je te donne tout mon courage. T'es une cheffe.

Mes sincères remerciements à nos voisins de labo, les ingénieurs Clément Guillou et Amine Ben Mlouka de la plateforme protéomique PISSARO. Sans vous la protéomique ne serait pas pareille. Clément, merci pour ton aide pour les calculs statistiques, pour tes conseils sur les manips et ta sérénité à toute épreuve ! Amine, toi qui as aussi fait ta thèse sur le système BAC je dois te remercier infiniment pour toute l'aide que tu m'as apporté. Tu as été un vrai moteur durant ces trois ans, une source d'idées et de motivation quand j'en manquais. Tu as toujours suivi avec enthousiasme mes hypothèses, « Amine j'ai une idée !!! » sera LA phrase que représente ces trois années de thèse. Merci pour ton aide précieuse.

Mille mercis à mes ami(e)s qui sont comme ma famille et font que la vie est plus douce : Romano, Marinette, Alex, Nico, BB, Chabert, Palen, Mechri, la Bremard, Théo, Tristant, Céline, Julie, Antoine, Thibault. Merci à mes sœurs de cœur, Jeanne, Céline, Camille, Jessie, et la petite Gabrielle (la relève est assurée). Vous avoir auprès de moi c'est précieux. Merci pour tout.

Merci à Léo, l'amoureux, mais aussi mon meilleur ami. Merci pour ton soutien durant ses trois années. Certaines périodes n'étaient pas faciles mais tu as toujours été là pour m'encourager et croire en moi. Merci pour toutes les attentions que tu as eues envers moi ces derniers mois. Je mesure la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés et je sais que tu seras toujours là. J'ai hâte de commencer de nouvelles aventures avec toi.

Mes derniers remerciements vont à mes parents et mon frère. Papa, maman, merci pour tout l'amour que vous nous portez. Merci de m'avoir soutenu et encouragé à chaque étape de ma vie. Enfin, merci à mon grand frère pour qui j'ai énormément d'admiration et de fierté.

Merci pour tout.

J'ai épousé ma plume

Pour affronter les tempêtes et repousser la brume

Il y en a qu'une et elle m'absorbe

J'suis là pourtant mais j'suis absent

J'ai épousé ma plume

Sommaire

Revue bibliographique

Chapitre 1 : La bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
I. La taxonomie	1
II. Les caractéristiques microbiologiques	2
III. Un pathogène opportuniste	4
IV. La plasticité génomique	6
IV.1 Le core génome, la base génétique	7
IV.2 Le génome accessoire, une mosaïque individuelle.....	7
V. La résistance aux antibiotiques	8
V.1 La résistance intrinsèque.....	11
V.2 La résistance acquise.....	14
V.3 La résistance adaptative	15
V.4 Les nouvelles approches thérapeutiques	16
VI. Le cycle de l'infection respiratoire aiguë	18
VI.1 L'adhésion tissulaire.....	19
VI.1.1 Les pili de type IV.....	19
VI.1.2 Le flagelle.....	20
VI.1.3 Les lectines	21
VI.1.4 Le lipopolysaccharide.....	22
VI.2 L'invasion cellulaire locale	23
VI.2.1 La sécrétion des facteurs de virulence par les systèmes de sécrétion.....	23
VI.2.1.1 Le système de sécrétion de type 1	24
VI.2.1.2 Le système de sécrétion de type 2	25
VI.2.1.2.1 L'exotoxine A.....	26
VI.2.1.2.2 Les élastases LasB et LasA	26
VI.2.1.2.3 CbpD et son produit de clivage LasD	27

VI.2.1.2.4 Les phospholipases C	27
VI.2.1.2.5 La pyocyanine	28
VI.2.1.3 Le système de sécrétion de type 3	28
VI.2.1.4 Le système de sécrétion de type 5	29
VI.2.1.5 Le système de sécrétion de type 6	30
VI.2.2 Les sidérophores pour la capture du fer	31
VI.3 La dissémination épithéliale et systémique.....	32
VII. La régulation des facteurs de virulence par le quorum sensing	33
Chapitre 2 : Les biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	36
I. Les réseaux de régulation favorisant la transition de la vie planctonique vers la vie biofilm chez les bactéries	37
I.1 Le quorum sensing.....	37
I.2 La régulation par les petits ARNs non codants (ARNnc)	37
I.3 Le second messager c-di-GMP	38
I.4 Le réseau Gac/Rsm	40
II. L'infection chronique liée au cycle de vie du biofilm	42
II.1 L'adhésion réversible puis irréversible.....	43
II.2 La formation de microcolonies et la maturation	46
II.2.1 Les exopolysaccharides.....	47
II.2.1.1 L'alginate	47
II.2.1.2 Le Pel et le Psl.....	48
II.2.2 L'ADN extracellulaire (ADNe).....	49
II.2.3 Les rhamnolipides (RLs).....	50
II.2.3.1 La diversité structurale.....	50
II.2.3.2 La synthèse des RLs	52
II.2.3.3 La régulation de la synthèse des RLs par le QS et l'environnement	53
II.2.3.4 Les rôles des RLs dans la formation de biofilm.....	54
II.2.4 Les protéines de la matrice	56
II.3 La dispersion du biofilm.....	57
III. La physiologie des biofilms et l'antibiorésistance	61
III.1 Les microenvironnements favorisent la tolérance.....	61

III.2	Induction de la tolérance par la barrière protectrice de la matrice.....	63
III.3	La tolérance par l'expression génique biofilm-dépendant	64
III.4	L'acquisition de gènes de résistance.....	65
III.5	La tolérance face au système immunitaire	65
III.6	Mini-Revue "The Biofilm Resistance: Many responses but Still Many Questions", Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	66

IV. Les récentes avancées de la recherche dans la lutte contre les biofilms 73

Projet de recherche

Partie 1 : Étude approfondie de la protéine BacA 77

I. Contexte et objectifs de l'étude..... 78

II. Article : BacA : a possible regulator that contributes to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* 80

III. Discussion et conclusion..... 112

Partie 2 : Analyse bio-informatique approfondie, lien avec la littérature et tentative d'annotation fonctionnelle des protéines BAC 80

I. La bio-informatique comme premier outil de réponse à une question biologique 114

II. Contexte et objectifs de l'étude..... 115

III. Résultats..... 116

III.1 La protéine BacB..... 116

III.2 Les protéines BacC et BacD, un nouveau couple NfeD/SPFH ? 124

III.2.1 La protéine BacC 124

III.2.2 La protéine BacD 132

III.3 La protéine BacE..... 145

III.4 La protéine BacF..... 155

IV. Discussion et hypothèses sur la régulation du système BAC 163

Partie 3 : Explorations préliminaires des protéines BacB et BacD	80
Chapitre 1 : La protéine BacB	172
I. Contexte et objectifs de l'étude	172
II. Résultats.....	173
II.1 Purification de la protéine BacB _{6His}	173
II.1.1 Vérification de l'induction à l'IPTG	173
II.1.2 Optimisation du protocole de purification de BacB _{6His} en condition native	174
II.1.2.1 Méthodes N°1	174
II.1.2.2 Méthode N°2.....	176
II.1.2.3 Méthode N°3.....	177
II.1.3 Confirmation de la présence de BacB _{6His} par Western Blot	177
II.1.4 Essai de purification de la protéine BacB _{6His}	178
II.1.5 Conclusion.....	180
II.2 Études phénotypiques.....	180
II.2.1 Contrôle du mutant Δ bacB	180
II.2.2 Étude de la survie du mutant Δ bacB	181
II.2.3 Conclusion et discussion	185
Chapitre 2 : La protéine BacD et premières investigations des lipid rafts de <i>P. aeruginosa</i>	198
I. Les lipid rafts et les microdomaines fonctionnels membranaires	198
II. Contexte et objectif de l'étude.....	200
III. Résultats et discussion.....	201
III.1 Études phénotypiques.....	201
III.2 Analyse protéomique des lipid rafts de <i>P. aeruginosa</i>	204
III.3 Conclusion	212
Conclusion générale et perspectives	199

Matériels et méthodes

I.	Les souches bactériennes	220
II.	Les études de biologie moléculaire	220
II.1	Vérification de l'insertion du transposon MAR2xT7 par PCR	220
II.1.1	Choix des amorces et extraction de l'ADN	220
II.1.2	Paramètres du cycle PCR et migration sur gel d'agarose	221
II.2	RT-PCR	221
II.2.1	Extraction des ARN totaux	221
II.2.2	RT des ARN en ADNc	222
II.2.3	PCR et migration sur gel d'agarose	222
III.	Les études phénotypiques	223
III.1	Courbes de croissance.....	223
III.1.1	Croissance en LB seul	223
III.1.2	Croissance en condition de stress.....	223
III.2	H ₂ O ₂ et sucrose killing	224
III.3	Mobilités sur milieu semi-solide	224
III.4	Mesure de la fluidité membranaire par anisotropie	225
III.5	Mesure de l'adhésion bactérienne sur les cellules pneumocytaires A549.....	226
IV.	Les études microscopiques	227
IV.1	Mesure de la densité cellulaire par comptage.....	227
IV.2	Observation des biofilms à l'interface solide-liquide par microscopie confocale et quantification de la biomasse	228
V.	L'étude des rhamnolipides	229
V.1	Préparation des échantillons	229
V.2	Analyse par spectromètre de masse 6545XT AdvanceBio Q-TOF	229
V.3	Traitement des données avec le logiciel Mass Hunter Qualitative Analysis pour l'identification et la quantification.....	230
VI.	Les études protéomiques	234
VI.1	Extraction des protéines intracellulaires	234

VI.1.1	À partir d'une culture planctonique	234
VI.1.2	À partir d'une culture biofilm	234
VI.1.3	Extraction des DRM et des DSM	235
VI.2	Détermination de la concentration protéique par dosage de Bradford	235
VI.3	Électrophorèse SDS-PAGE	236
VI.3.1	Préparation de l'échantillon et paramètres de migration	236
VI.3.2	Coloration des protéines au nitrate d'argent 0,1 %	237
VI.3.3	Digestion des protéines par la méthode « gel-based »	238
IV.1	Préparation de l'échantillon et paramètres de migration	238
VI.3.4	Coloration des protéines au bleu de Coomassie G250	238
VI.3.5	Digestion trypsique et dosage peptidique	238
VI.4	Analyse par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Elite	239
VI.5	Analyse par le spectromètre de masse Q-Exactive Plus	240
VI.6	Traitement des données spectrales pour identification et/ou quantification	241
VI.6.1	Identification des protéines par Proteome Discoverer	241
VI.6.2	Quantification relative des protéines par Progenesis LC-MS/MS	241
VII.	Purification par la méthode IMAC en vue d'une étude structurale.....	242
VIII.	Les logiciels bio-informatiques utilisés pour l'étude du système BAC .	243
	Annexes.....	221
<hr/>		
	Références bibliographiques	293
<hr/>		
	Productions scientifiques	
<hr/>		
I.	Liste des publications	346
II.	Communication nationale	346
III.	Communication internationale	346

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Observation de <i>P. aeruginosa</i> selon trois méthodes.....	2
Figure 2 Les différents types de colonies formées par <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 3 Pourcentage d'isolats de <i>P. aeruginosa</i> résistants aux carbapénèmes dans différents pays (données de 2021).	10
Figure 4 Les acteurs moléculaires responsables de la multirésistance chez <i>P. aeruginosa</i>	11
Figure 5 Les différentes familles de pompes à efflux.	13
Figure 6 Les mécanismes de virulence associés à la pathogenèse de <i>P. aeruginosa</i>	18
Figure 7 Les appendices membranaires de <i>P. aeruginosa</i> et la structure du <i>pilus</i> de type IVa.....	20
Figure 8 Représentation schématique du flagelle de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 9 Structure du LPS.	22
Figure 10 Les systèmes de sécrétion et leurs protéines effectrices associées chez <i>P. aeruginosa</i>	25
Figure 11 Mécanisme de capture du fer par la pyoverdine et régulation des gènes associés.	32
Figure 12 Hiérarchie des systèmes de QS et régulation des facteurs de virulence associés.	34
Figure 13 Réseaux des voies de régulation par le c-di-GMP impliquées dans la formation de biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	39
Figure 14 Le réseaux Gac/Rsm impliqué dans la transition réversible planctonique-biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	41
Figure 15 Les étapes de formation du biofilm.	43
Figure 16 Les forces mises en jeu lors de l'étape d'adhésion réversible.	44
Figure 17 L'adhésion réversible et irréversible et les acteurs mis en jeu.....	45
Figure 18 Structure des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> selon les sources de carbone.....	46
Figure 19 Régulation de la biosynthèse d'alginate par le facteur sigma AlgU.	48
Figure 20 Les différentes structures des rhamnolipides.....	51
Figure 21 La biosynthèse des rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i>	52
Figure 22 La mobilité de type swarming chez <i>P. aeruginosa</i>	54
Figure 23 Les systèmes de circulation au sein des biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	56
Figure 24 Les mécanismes de détachement du biofilm.	58
Figure 25 Mécanismes permettant la dispersion du biofilm.....	59
Figure 26 L'environnement hétérogène des biofilms.....	62

Figure 27 Les mécanismes de résistance et de tolérance face aux agents antimicrobiens.	64
Figure 28 Les hypothèses du fonctionnement du système BAC.	76
Figure 29 Homologie des gènes du système BAC chez PAO1 et PA14.	77
Figure 30 Stratégie employée pour l'étude quantitative du protéome des biofilms formés par la souche WT et $\Delta bacA$ selon l'approche label-free.	79
Figure 31 Stratégie employée pour l'étude bio-informatique des protéines du système BAC.	116
Figure 32 BacB contient un domaine PspA/IM30.	117
Figure 33 Comparaison entre les protéines de la famille PspA/IM30.	119
Figure 34 La protéine BacB est un homologue structural des protéines PspA et Vipp1. ...	120
Figure 35 Les différentes vues de la forme tridimensionnelle de l'oligomère PspA d' <i>E. coli</i>	122
Figure 36 Les structures de la protéine Vipp1.	123
Figure 37 Les différents états d'oligomérisation des protéines Vipp1 et PspA.	124
Figure 38 BacC est une protéine transmembranaire.	125
Figure 39 BacC partage une faible homologie de séquence avec les NfeD homologues de la sous-famille NfeD2.	128
Figure 40 La protéine BacC semble être un homologue structural des protéines NfeD. ...	129
Figure 41 Ancrage de la protéine BacC à la membrane grâce à ces trois domaines transmembranaires.	131
Figure 42 BacD est une protéine membranaire de la famille des protéines SPFH.	133
Figure 43 Modèle de co-évolution entre les protéines NfeD et SPFH.	135
Figure 44 BacD contient des répétitions EA caractéristiques des p-flotillines.	136
Figure 45 Qualité du modèle de BacD prédit par AlphaFold.	137
Figure 46 Le domaine Band7/SPFH prédit chez BacD est superposable à celui des protéines SPFH.	138
Figure 47 Similarités de structure et de localisation entre l'hétérodimère HflK/C et BacD.	140
Figure 48 La structure du complexe KFC.	141
Figure 49 Le rôle du complexe KFC dans la régulation du contrôle qualité des protéines par l'inhibition de l'activité protéase de FtsH.	143
Figure 50 Modèle structural hypothétique de BacD construit à partir du template de MVP.	144
Figure 51 BacE est une protéine de la famille des protéines ATPase AAA+.	145
Figure 52 Organisation moléculaire des ATPases AAA+.	147
Figure 53 BacE contient les motifs conservés du domaine AAA.	149
Figure 54 Les domaines et structures des ATPases AAA+.	150
Figure 55 Qualité du modèle de BacE prédit par AlphaFold.	151

Figure 56 Les motifs et insertions d'éléments structuraux dans le domaine AAA de BacE.	152
Figure 57 Domaines identifiés chez la protéine BacF.	155
Figure 58 Domaines et motifs présents chez les différents membres de la superfamille des phospholipases D.	157
Figure 59 BacF fait partie de la superfamille des phospholipases D.	158
Figure 60 Le motif HKD de BacF adopte une structure similaire à celui des autres membres.	159
Figure 61 La poche formée par le dimère prédit de BacF est similaire à la poche de Nuc et PLD6.	162
Figure 62 La réponse Psp chez <i>E. coli</i>	165
Figure 63 La réponse Psp chez <i>B. subtilis</i>	166
Figure 64 Représentation schématique de l'opéron <i>pspA-ydj</i> de <i>B. subtilis</i>	167
Figure 65 La réponse Psp chez <i>M. tuberculosis</i>	168
Figure 66 La réponse Psp chez <i>Y. enterocolitica</i>	169
Figure 67 Hypothèse sur la régulation de l'opéron <i>bac</i>	171
Figure 68 Validation de l'induction par l'IPTG.	173
Figure 69 Profil électrophorétique des protéines solubles extraites en condition inductrice selon la méthode 1.	174
Figure 70 Profil électrophorétique des protéines insolubles extraites en condition inductrice selon la méthode 1.	175
Figure 71 Profil électrophorétique des protéines solubles extraites selon la méthode 2....	176
Figure 72 Profil électrophorétique des protéines solubles extraites selon la méthode 3....	177
Figure 73 Détection de la protéine BacB _{6His} par Western Blot dans les extraits protéiques obtenus selon la méthode d'extraction 2.	178
Figure 74 Profil électrophorétique de la purification de BacB _{6His}	179
Figure 75 Études préliminaires réalisées sur la souche $\Delta bacB$	181
Figure 76 Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture à pH 9.	182
Figure 77 Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture hyperosmotique. ..	183
Figure 78 Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture alcalin.	183
Figure 79 Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture en présence d'éthanol.	184
Figure 80 Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu fortement oxydatif ou osmotique.	185
Figure 81 Mécanisme de protection de la membrane par Vipp1.	189
Figure 82 Modèle classique en dôme formé par le complexe ESCRT-III permettant la constriction et la fission membranaire.	191

Figure 83 Les protéines PspA et Vipp1 sont homologues à ESCRT-III.....	192
Figure 84 Les protéines PspA et Vipp1 sont capables de remodeler les membranes.	193
Figure 85 Hypothèses du mécanisme de remodelage effectué par PspA et Vipp1.	195
Figure 86 Vipp1 s'oligomérisé à la membrane ou en dehors grâce à son activité ATPase.	196
Figure 87 Stratégie employée pour l'étude quantitative des lipid rafts de la souche WT selon l'approche label-free.....	201
Figure 88 Études préliminaires réalisées sur la souche $\Delta bacD$	202
Figure 89 Étude phénotypique menée sur la souche $\Delta bacD$	202
Figure 90 Analyses protéomiques des DRM.....	205
Figure 91 Hypothèse de fonctionnement du système BAC.....	217
Figure 92 Quantification de la densité cellulaire avec la fonction "spot" du logiciel IMARIS.	228
Figure 93 Méthode analytique employée pour l'étude des rhamnolipides.	232
Figure 94 Préparation de la gamme étalon pour réaliser le dosage de Bradford.....	236
Figure 95 Principe de la purification basée sur la méthode IMAC.	243
Figure 96 Stratégie employée par les logiciels de modeling basée sur l'homologie structurale.	244
Tableau 1 Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	1
Tableau 2 Les annotations génomiques et le nom des protéines BAC.	76
Tableau 3 Systèmes de sécrétion.....	207
Tableau 4 Transport.....	208
Tableau 5 Réponse à un stimulus.....	209
Tableau 6 Métabolisme énergétique et des lipides.....	210
Tableau 7 Maintien de la cellule et mobilité.....	212
Tableau 8 Les amorces utilisées pour la vérification des mutants.....	220
Tableau 9 Les amorces utilisées pour la RT-PCR.	222
Tableau 10 Conditions de stress choisie pour l'étude.	224
Tableau 11 Liste des rhamnolipides et de leurs (m/z) recherchés dans l'étude.	233
Tableau 12 Composition d'un gel SDS-PAGE.	237
Tableau 13 Composition d'un gel label-free.....	238

Liste des abréviations

AAA : ATPase associated to a variety of cellular activities
ABC : adenosine triphosphate-binding-cassette
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine di-phosphate
ADPRT : adénosine diphosphate-ribosyltransférerase
AF : acide formique
AI : auto-inducteurs
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNt : acide ribonucléique de transfert
ATP : adénosine triphosphate
CDD : consensus domain dictionary
CbpD : chitin-binding protein D
c-di-GMP : di-guanosine monophosphate cyclique
CESR : cell envelope stress response
CID : collision-induced dissociation
CMB : concentration minimale bactéricide
CMI : concentration minimale inhibitrice
CTIN : comité technique national des infections nosocomiales
DGC : diguanylate cyclases
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
dTDP-L-rhamnose : thymidine diphosphate
DUF : domain of unknown function
EF2 : elongation factor 2
EIC : extracted ion chromatogram
EPS : exopolysaccharide
ESCRT-III : endosomal sorting complex required for transport III
ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter*
FAS : (factor activating exoenzyme S)
GAP : GTPase activating protein
GLASS : Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System
GMQE : global model quality estimate
GTP : guanosine-5' -triphosphate
HAA : (3-(3-hydroxy-alkanoyloxy) -alkanoic acids)
Hcp : hemolysin coregulated protein

Hxc : homologue xcp
IMAC : chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
IMPACTT : Immunoglobulin IgY *pseudomonas* A clinical trial for cystic fibrosis treatment
IL : interleukine
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kb : kilobases
kDa : kilodalton
LadS : lost adherence sensor
LPS : lipopolysaccharide
LTZ : lipid transfer zones
MATE : multidrug and toxic compound extrusion
MFP : membrane fusion protein
MFS : major facilitator superfamily
MOI : multiplicity of infection
NADPH : nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NAGGN : N-acetylglutaminyglutamine
NCBI : National center for biotechnology information
NfeD : nodulation formation efficiency D
Ni-NTA : nickel-nitrilotriacetic acid
NfeD : nodulation formation efficiency D
OMF : outer membrane fusion
OMS : organisation mondiale de la santé
OPS : polysaccharide O
PACE : proteobacterial antimicrobial compounds efflux
PAMR : *P. aeruginosa* multirésistantes
PCR : polymerase chain reaction
PDB : protein data bank
PIR : protein information resource
PLA₂ : phospholipase A₂
PMF : force protomotrice
P-NTPase : P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
Plc : phospholipase C
QS : *quorum sensing*
RetS : regulator of EPS and SSTIII
RND : resistance nodulation cell division
ROS : reactivities oxygen species
Sec : general secretary

SEM : standard error of the mean
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquis
Smart : simple modular architecture research tool
SMR : small multidrug resistance
SPFH : stomatin prohibitin flotillin HflK/C
SRH : second region of homology
SST : système de sécrétion de type
Tat : twin-arginine translocation
TNF α : tumour necrosis factor α
UHPLC : ultra-high performance liquid-chromatographic
UniProt : universal protein resource
VBNC : viable but nonculturable
Vgr : valine-glycine repeat protein
Xcp : extracellular protein

Revue bibliographique

Chapitre 1 : La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

C'est en 1850 que le physicien militaire français Charles-Emmanuel Sédillot, révèle l'implication de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) dans des infections chez l'Homme, en observant des particules circulaires dans un pus de couleur bleu-vert. Elle sera isolée pour la première fois, 30 ans plus tard, par Carle Gessard, pharmacien des armées et biologiste français grâce à une expérience sur les colorations bleues-vertes du pus laissées sur les bandages recouvrant les plaies des soldats (Gessard, 1984). Il l'a décrira d'ailleurs sous le nom de *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) en raison de la production d'un pigment pyocyanique bleu-vert.

I. La taxonomie

Le mot « *pseudomonas* » vient du grec, où « pseudo » signifie imitation et « monas » unité. En latin, « *aeruginosa* » signifie vert-de-gris faisant une nouvelle fois référence aux pigments sécrétés par la bactérie. Cette bactérie du genre *Pseudomonas* et de l'espèce *aeruginosa* appartient à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Pseudomonaceae* (**Tableau 1**). Le genre *Pseudomonas* regroupe plusieurs espèces dont certaines pathogènes chez les Hommes ou chez les plantes comme *P. syringae*. D'autres espèces ont reçu une attention particulière en raison de leurs propriétés métaboliques comme *P. stutzeri* capable de dénitrification (Miyahara et al., 2010).

Règne	Bactérie
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>aeruginosa</i>

II. Les caractéristiques microbiologiques

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif non sporulant (**Figure 1**). Les cellules mesurent entre 1 à 5 μm de long et 0,5 à 1 μm de diamètre selon les souches. Les cellules sont isolées, se regroupent en amas ou forment de courtes chaînes.

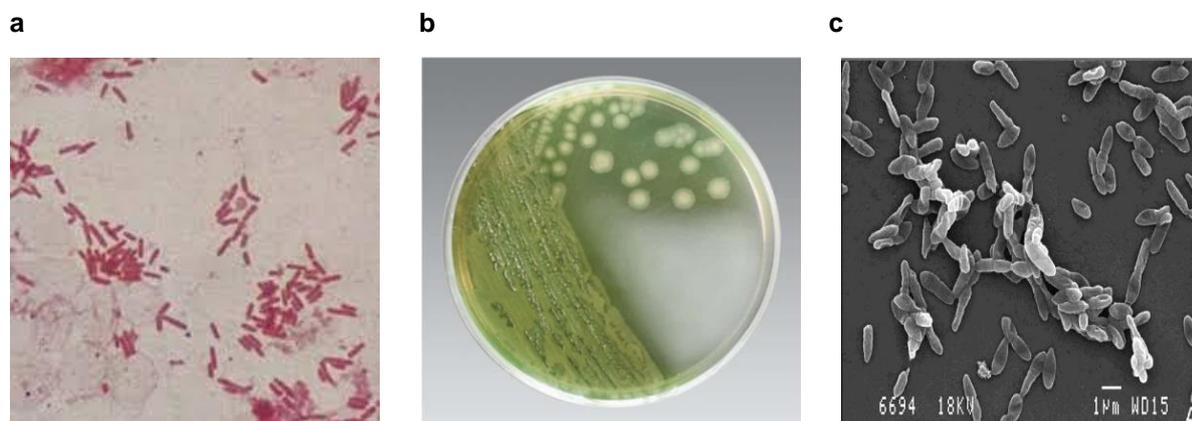


Figure 1 | Observation de *P. aeruginosa* selon trois méthodes.

P. aeruginosa en coloration de Gram (<http://www.bacteriologie.wikibis.com/pseudomonas.php>) (**a**), sur milieu de culture gélosé (Thermo Scientific™) (**b**), fixée sur du verre et observée par microscopie à balayage électronique (Deligianni et al., 2010) (**c**).

La mobilité de *P. aeruginosa* fait partie intégrante de son pouvoir pathogène. Ainsi, pour coloniser de nouvelles niches ou pour propager l'infection, elle se déplace dans son environnement grâce à de nombreux appendices. Les différents types de mobilité dont le swimming, le swarming, le twitching et le sliding ont été classifiés par Jorgen Henrichsen (Henrichsen, 1972).

En milieu liquide, les bactéries isolées les unes des autres adoptent, grâce à leur flagelle monotriche polaire, une mobilité qui s'apparente à de la nage appelée le « swimming » (Ha et al., 2014b). En milieu solide, ce sont plutôt les *pili* de type IV qui sont mobilisés. Leurs extensions et rétractations successives permettent à la bactérie de se déplacer sur différents types de supports. Ce déplacement communautaire se nomme le « twitching » (Burrows, 2012). En milieu semi-solide, le flagelle et les *pili* de type IV interviennent ensemble pour le déplacement de type « swarming » (Kohler et al., 2000). Cette mobilité communautaire implique aussi la sécrétion par les bactéries d'agents de surface humectant comme les rhamnolipides (Caiazza et al., 2005). Enfin, en l'absence du flagelle et des *pili* de type IV, la bactérie adopte une mobilité de type « sliding ». Dans ce cas, ce sont seulement les agents de surface humectant qui permettent le déplacement de la bactérie (Murray & Kazmierczak, 2008).

Depuis le travail de Jorgen Henrichsen, d'autres modes de déplacement ont été décrits comme la mobilité de type « surfing ». Le surfing mobilise le flagelle mais ne nécessite pas la sécrétion d'agents humectant (Yeung et al., 2012). D'autres souches sont au contraire immobiles. Une étude menée par McManus *et al.*, a mis en évidence le lien entre la mobilité et la virulence de *P. aeruginosa* (Mcmanus et al., 1978). En effet, certains isolats cliniques immobiles, provenant de plaies de grands brûlés, présentaient une virulence diminuée.

P. aeruginosa est une bactérie mésophile. Sa température optimale de croissance se situe entre 30°C et 37°C, mais elle est capable de se développer dans des gammes de températures allant de 4°C à 41°C. C'est une bactérie aérobie avec un métabolisme oxydatif, c'est-à-dire qu'elle utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. En l'absence d'oxygène elle peut respirer anaérobiquement. Dans ce cas, c'est le nitrate présent dans l'environnement qui sert d'accepteur final d'électrons. L'utilisation du nitrate lui permet ainsi de survivre dans des environnements hostiles, pauvres en oxygène comme par exemple les sols ou les poumons des patients atteints de mucoviscidose. En effet, il a été montré que la distribution de l'oxygène dans les poumons de ces patients était très hétérogène. Dans ces différents environnements, *P. aeruginosa* utilise des mécanismes oxydatifs, de dénitrification ou encore de fermentation (Schobert & Jahn, 2010; Yoon et al., 2002).

En laboratoire, sa culture est facile car elle ne nécessite pas d'exigence nutritive. *P. aeruginosa* se développe sur des milieux ordinaires comme le Mueller Hinton ou sur des milieux sélectifs tels que les géloses Drigalski ou contenant du cétrimide.

Selon son origine, *P. aeruginosa* forme trois types de colonies. Les souches environnementales forment de grandes colonies bombées à bords irréguliers avec des reflets irisés. Cette morphologie est appelée « œuf sur plat ». Les souches cliniques sont, quant à elles, en générale, de taille moyenne, lisses à bords réguliers. Cependant, certaines souches cliniques, isolées par exemple de patients atteints de mucoviscidose, sont larges et mucoïdes (**Figure 2**). Le caractère mucoïde apparaît une fois que la souche est établie dans le poumon. Il est dû à une hyperproduction d'alginate, un polysaccharide visqueux. Les souches mucoïdes sont caractéristiques d'une infection chronique (Winstanley et al., 2016). L'alginate permet à la bactérie de survivre dans l'environnement pulmonaire car il interfère avec la réponse immunitaire (Cobb et al., 2004) et confère aux bactéries une résistance à certains agents antimicrobiens (Boyd & Chakrabarty, 1995).

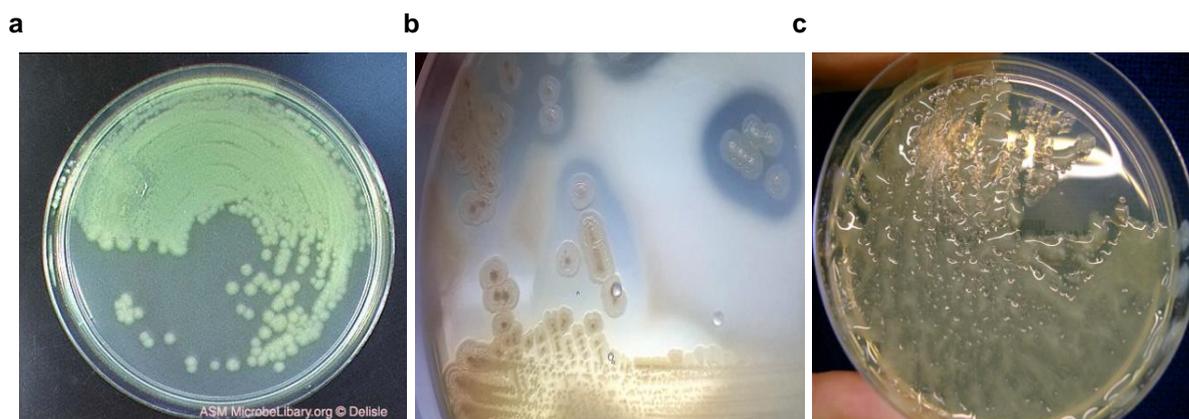


Figure 2 | Les différents types de colonies formées par *P. aeruginosa*. Souche de *P. aeruginosa* clinique (a), en « œuf sur le plat » (<http://www.puremicrobes.org/product/pseudomonas-aeruginosa>) (b), clinique mucoïde (Silvia Campana, Centre fibrose kystique, Université de Meyer, Florence) (c).

P. aeruginosa est facilement identifiable grâce à sa couleur vert foncé. Elle sécrète deux pigments : la pyocyanine (bleu) qui est spécifique de cette espèce et la pyoverdine (vert fluorescent) qui est commune au genre *Pseudomonas*. D'autres souches sécrètent un pigment appelé la pyorubine de couleur rouge ou la pyomélanine de couleur noir. Enfin, quelques souches sont non pigmentées.

III. Un pathogène opportuniste

P. aeruginosa est avant tout un germe saprophyte environnemental. Son réservoir est ubiquitaire, mais toujours en relation avec un environnement aqueux tel que, l'eau douce, les sols humides et la surface de la majorité des fruits et légumes.

P. aeruginosa est surtout connue en tant que bactérie pathogène majeure. Elle est cependant avirulente chez les personnes en bonne santé, mais en cas de contamination, elle provoque des infections externes localisées souvent associées à l'eau. Lors d'une baignade elle peut infecter l'oreille provoquant des otites. Elle est également responsable d'infections oculaires chez les porteurs de lentilles cornéennes. L'eau du robinet et les solutions d'entretien pour lentilles ont été identifiées comme les vecteurs de ces infections.

En revanche, en tant que bactérie opportuniste, elle profite de l'affaiblissement général des défenses de l'hôte. Compte-tenu de la fragilité des patients immunodéprimés, les infections sont sévères et associées à une mortalité élevée. *P. aeruginosa* infecte donc préférentiellement, les patients intubés-ventilés, greffés, en cure de chimiothérapie, en soins intensifs, les grands brûlés ou encore souffrant du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) ou de mucoviscidose.

À cause de son implication majeure dans un grand nombre et type d'infections, *P. aeruginosa* est la bactérie du genre *Pseudomonas* la plus étudiée du genre *Pseudomonas*.

Sous sa forme planctonique elle provoque des infections aiguës qui sont de courtes durées mais associées à une virulence élevée et des symptômes sévères. Les organes les plus touchés sont généralement les voies respiratoires, la vessie et la cornée. Sous forme sessile, elle induit des infections chroniques dont les symptômes apparaissent de façon cyclique. Ces infections chroniques perdurent sur de longues durées, parfois des années. Ces deux types d'infections seront abordées plus en détail par la suite.

Les sources de contamination sont multiples. Elles sont endogènes, lorsque la personne s'auto-infecte par le biais d'un site colonisé (peau, muqueuse ou système digestif). Lorsqu'elles sont exogènes, ce sont les réservoirs environnementaux, comme l'eau du robinet, le pommeau de douche, les spas, les bains thérapeutiques, les désinfectants et les aliments contaminés qui sont la source de la contamination.

P. aeruginosa est aussi régulièrement retrouvée dans les établissements de santé où elle est responsable d'infections nosocomiales (infections associées aux soins). Elle est d'ailleurs classée, depuis 2012, par l'organisme Santé Public France au 3ème rang des espèces bactériennes retrouvées dans les infections nosocomiales avec une prévalence de 8,4% derrière *Staphylococcus aureus* (15,9%) et *Escherichia coli* (26%). Les patients hospitalisés présentent un fort risque d'infection à *P. aeruginosa*. En effet, à l'hôpital ce sont, par exemple, les équipements de dialyse, les appareils d'assistance respiratoire ou encore le matériel médical implantable (prothèse, cathéter ou pacemaker) qui deviennent des vecteurs de contamination. Il a d'ailleurs été montré que le taux de contamination par voie exogène atteignait entre 50% et 70% dans un service de réanimation (Floret et al., 2009). Les biofilms à *P. aeruginosa* sont également retrouvés sur des surfaces inertes comme les lavabos, les toilettes, les douches et les humidificateurs. Ils représentent ainsi un réservoir pouvant contaminer les patients *via* des aérosols ou un vecteur contaminé.

P. aeruginosa est surtout connue pour son étroite implication dans les infections pulmonaires touchant les patients atteints de mucoviscidose. À la petite enfance, ces patients sont initialement colonisés par le Staphylocoque doré et *Haemophilus influenza*. C'est aux alentours de 2 ans, que les patients sont primo-infectés par *P. aeruginosa*. À l'âge adulte, 80% des patients sont colonisés par *P. aeruginosa*, principalement par des souches mucoïdes. La primo-infection à *P. aeruginosa* marque un tournant évolutif dans la maladie et bien souvent ce dernier amène à un pronostic réservé. La présence de *P. aeruginosa* entraîne une dégradation de la qualité de vie et une mortalité plus élevée (Evans et al., 1996; Wilson et al., 1997).

En effet, une fois que la bactérie est installée de manière définitive, l'infection devient chronique, induisant une inflammation pulmonaire récurrente et une dégradation des tissus qui va entraîner une mort précoce.

P. aeruginosa est un pathogène redoutable pour l'Homme en raison de sa forte capacité à s'adapter aux changements environnementaux. Cette versatilité lui permet de survivre dans des environnements parfois très hostiles. En cause, son génome riche en gènes impliqués dans le métabolisme, le transport de molécules, la résistance aux antibiotiques et la virulence.

IV. La plasticité génomique

P. aeruginosa possède l'un des plus grands génomes bactériens, expliquant ainsi sa remarquable adaptabilité. Chez cette espèce, le premier génome entièrement séquencé a été celui de la souche PAO1 (Stover et al., 2000), isolée d'un patient Australien. Elle est aujourd'hui la souche de référence utilisée dans un grand nombre d'études génétiques et fonctionnelles. Elle possède environ 6,2 millions de paires de bases (Mpb) dont 5587 cadres de lecture ouverts portés sur un chromosome circulaire unique. Par la suite, c'est le génome de l'isolat clinique PA14 provenant d'un grand brûlé et fortement virulent qui a été entièrement séquencé (D. G. Lee et al., 2006). Depuis, d'autres souches, également pathogènes pour l'Homme, ont-elles aussi été entièrement séquencées, comme PA7 (Roy et al., 2010), PAK (Cain et al., 2019), CF39S (Mathee et al., 2008) et LESB58 (Winstanley et al., 2009).

En comparaison avec le génome de PAO1, PA14 possède environ 6,5 Mpb dont 5894 cadres de lecture ouverts. Bien que les génomes de PAO1 et PA14 soient en grande partie identiques, la souche PA14 possède 230 cadres de lecture absents chez la souche PAO1. Certains jouent un rôle dans la pathogénicité, ce qui explique que la souche PA14 soit plus virulente que la souche PAO1 (Ji et al., 2002; Mahajan-Miklos et al., 1999). La souche PA7, isolée d'un patient Argentin, est quant à elle résistante à plusieurs familles d'antibiotiques. La souche LESB58, isolée d'un enfant atteint de mucoviscidose, est appelée « Liverpool Epidemic Strain » en raison de sa forte transmissibilité entre patients atteints de mucoviscidose, et même entre individus sains (Cheng et al., 1996).

Le séquençage est l'outil privilégié pour constituer la carte génétique d'un organisme. Aujourd'hui, plus de 14 000 génomes d'espèces de *Pseudomonas*, qu'ils soient complets ou en phase d'assemblage, sont recensés et accessibles dans la base de données appelée Pseudomonas Genome Database (www.pseudomonas.com). Les études génomiques comparatives révèlent que ces génomes sont bien conservés, malgré une taille allant de 6 et 7 Mpb suivant les souches.

Ainsi, la partie génomique commune à toutes les souches a été appelée « core génome » tandis que la partie flexible a été appelée « génome accessoire ». Ce dernier est d'ailleurs responsable de la différence de taille observée entre les génomes.

IV.1 Le core génome, la base génétique

Le core génome représente 90% du génome total. C'est un ensemble de matériel génétique commun à toutes les souches. Bien qu'il soit hautement conservé, il reste tout de même dynamique. En effet, par mutation ponctuelle ou délétion provoquant la perte du gène, environ 0,5 à 0,7% des séquences sont divergentes.

Le core génome code notamment des gènes impliqués dans des voies métaboliques et des facteurs de virulence communs à toutes les souches. Par exemple, une étude sur un panel de 18 souches de *P. aeruginosa* a montré que parmi les 267 facteurs de virulence recherchés, 97% étaient présents chez toutes ces souches (Wolfgang et al., 2003).

IV.2 Le génome accessoire, une mosaïque individuelle

Le génome accessoire représente environ 10% du génome total. Ces fragments d'ADN (acide désoxyribonucléique) ne sont pas distribués aléatoirement dans le core génome mais s'insèrent préférentiellement dans des régions géniques de haute plasticité, telles que celles des gènes à ARNt (acide ribonucléique de transfert) (Mathee et al., 2008; Williams, 2002). *P. aeruginosa* a acquis une vingtaine de ces régions par transfert horizontal. Ces régions sont appelées île ou îlot génomique lorsqu'elles font respectivement moins de 10 kb (kilobases) ou plus de 10 kb.

Le génome accessoire a un rôle crucial dans l'évolution du génome du *P. aeruginosa*. Certaines souches ont acquis des caractéristiques avantageuses, leur permettant de s'adapter à une niche écologique hostile. Ainsi, elles peuvent persister dans un environnement pollué ou contenant des métaux lourds grâce à l'acquisition de nouvelles voies cataboliques permettant la dégradation de ces composés (Aguilar-Barajas et al., 2006). Ces souches peuvent ainsi être des acteurs importants dans la bioremédiation des sols.

D'autres souches ont, quant à elles, une incidence forte dans le domaine médical. En effet, certaines souches, comme PA14, sont devenues fortement pathogènes grâce à l'acquisition de gènes codant des facteurs de virulence et/ou des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Dans ce cas, l'îlot génomique est appelé îlot de pathogénicité. La souche PA14 en porte deux : l'îlot PAPI-1 et PAPI-2 (He et al., 2004).

Un intérêt tout particulier doit être porté à ces îlots car ils sont en partie responsables de la dissémination de ces gènes de virulence au sein des populations bactériennes.

En additionnant l'antibiorésistance naturelle et les îlots de pathogénicité, les souches deviennent ainsi multi- voire toto-résistantes aux antibiotiques.

V. La résistance aux antibiotiques

L'arrivée des antibiotiques en 1940 a complètement révolutionné la façon de traiter les patients, permettant ainsi une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses. Cependant, la résistance bactérienne aux antibiotiques est rapidement devenue un problème de santé public et ce à l'échelle mondiale. Aujourd'hui le lien entre l'usage excessif d'antibiotiques et l'émergence de la résistance est clairement établi. C'est à la fin des années 1990 que l'évolution de la résistance à différentes familles d'antibiotiques est devenue très préoccupante (Andrade et al., 2003; Davies, 1996; McGowan, 2006).

La résistance aux antibiotiques au sein des populations bactériennes commence par la sélection des bactéries résistantes durant l'exposition à l'antibiotique. Dans le même temps, la destruction d'une partie du microbiote sensible à l'antibiotique laisse la place aux bactéries résistantes. Ces dernières sont transmises par contact d'une personne à l'autre et dans l'environnement, menant à terme à une transmission globale (Murthy, 2001).

Si le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* implique fortement sa rapide capacité à évoluer génétiquement, il est aussi permis par sa forte résistance naturelle aux antibiotiques. De plus, l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal est venue compléter ces gènes de résistance naturellement présents chez *P. aeruginosa*, provoquant ainsi une multirésistance aux antibiotiques. Cette multirésistance est décrite comme la résistance (ou la diminution de la sensibilité) à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages. Ces trois classes sont les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines, monobactames et les carbapénèmes), les fluoroquinolones et les aminosides.

Les souches PAMR (*P. aeruginosa* multirésistantes) posent un grave problème de santé public car elles compliquent très sérieusement la prise en charge du patient et diminuent les chances de rétablissement. Cet échec thérapeutique est accompagné d'une augmentation de la durée d'hospitalisation, de la durée de ventilation (pour les malades en réanimation) et du coût du séjour à l'hôpital.

La propagation des souches PAMR dans le monde n'est pas la seule source d'inquiétude dans la communauté scientifique. En effet, c'est en fait tout un groupe de bactéries responsables d'infections nosocomiales et multirésistantes qui devient problématique. Ces bactéries ont été regroupées par Rice en 2006 sous l'acronyme « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter*.

Face à cette situation préoccupante, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a mis au point un système de surveillance épidémiologique appelé GLASS (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System). Il permet, dans un premier temps de collecter en continu et de façon standardisée les données d'établissements de santé mais aussi de la consommation d'antimicrobiens dans les pays collaborateurs. L'analyse de ces données permet entre autres, d'alerter sur l'arrivée d'une possible épidémie selon la circulation des isolats bactériens, de mettre en lumière les bactéries les plus problématiques et de mettre au point une stratégie de lutte adaptée. C'est ainsi qu'en 2017, soit plus de 10 ans après l'alerte donnée par Rice, l'OMS a rendu public une liste de bactéries pour lesquelles il devient urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques. Sur trois niveaux de priorité, *P. aeruginosa* se retrouve en priorité critique avec *Acinetobacter baumannii* et les *Enterobacteriaceae*, pour sa résistance aux carbapénèmes.

En 2021, d'après le rapport mis en ligne en 2023, seuls 2 pays (Danemark et Finlande) sur 44 ont moins de 5% d'isolats de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes alors que dans 6 pays (Biélorussie, Géorgie, Moldavie, Russie, Serbie et Ukraine) le pourcentage d'isolats résistants aux carbapénèmes est égal ou supérieur à 50% (**Figure 3**).

Une étude publiée en 2022 a estimé qu'en 2019, dans le monde, près de 5 millions de décès étaient associés aux bactéries résistantes aux antimicrobiens, dont 1,3 millions directement attribuables à l'antibiorésistance.

En 2014, le journal « *Review on Antimicrobial Resistance* » prédisait déjà qu'à l'échelle mondiale, le nombre de décès dû à la résistance aux antibiotiques pourrait s'élever à 10 millions chaque année d'ici 2050, dépassant le nombre de décès dû au cancer.

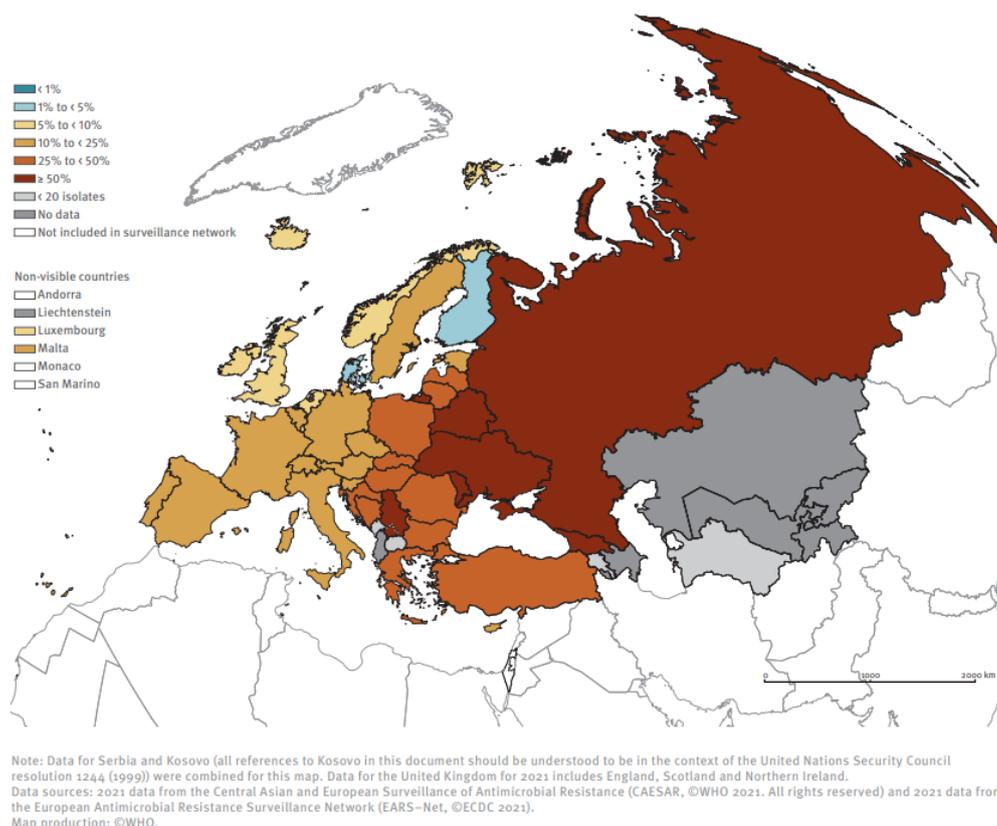


Figure 3 | Pourcentage d'isolats de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes dans différents pays (données de 2021).

Figure issue du Rapport de surveillance de la résistance antimicrobienne en Europe mis en ligne par l'OMS en 2023.

La communauté scientifique fait donc face à un enjeu sanitaire mondial qui impose de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour inverser la tendance. Pour trouver de nouvelles thérapies efficaces, il est important de comprendre les mécanismes de résistance mis en place lors d'une exposition à un antibiotique.

Concernant *P. aeruginosa*, de nombreuses données sont disponibles dans la littérature et les recherches s'accordent à discriminer trois types de résistance : la résistance intrinsèque, acquise et adaptative (Hoon Jeong et al., 2015; Lister et al., 2009; Potron et al., 2015; Strateva & Yordanov, 2009; Sun et al., 2014) (**Figure 4**). De façon générale, les acteurs moléculaires sont communs dans au moins deux de ces trois types de résistance. Parmi eux, les porines restreignent l'accès de l'antibiotique à sa cible et les pompes d'efflux expulsent les antibiotiques hors de la cellule. Enfin la bactérie peut modifier par mutation la cible de l'antibiotique pour limiter ou inhiber son action.

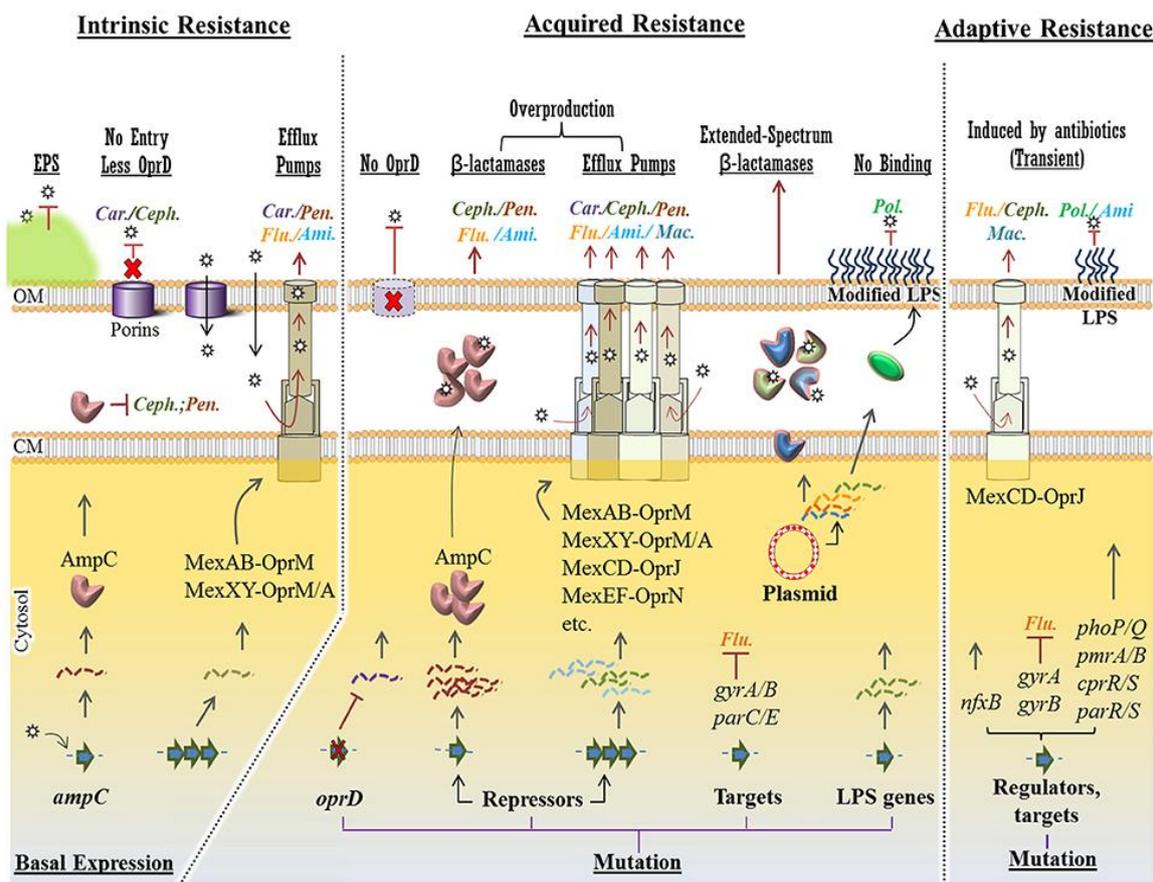


Figure 4 | Les acteurs moléculaires responsables de la multirésistance chez *P. aeruginosa*.

CM : membrane cytoplasmique *i.e.* membrane interne, OM : membrane externe. Les étoiles représentent les antibiotiques (Car. : carbapénème, Ceph. : céphalosporine, Pen. : pénicilline, Flu. : fluoroquinolone, Ami. : aminoglycoside, Mac. : macrolide, Pol. : polymyxine). Les lignes pointillées indiquent les niveaux de transcription des gènes (Matar et al., 2017).

V.1 La résistance intrinsèque

Les gènes qui participent à la résistance intrinsèque sont continuellement exprimés à un niveau basal pour garantir une protection permanente contre les molécules toxiques.

La majorité des antibiotiques utilisés pour traiter les infections à *P. aeruginosa* doivent traverser les membranes. C'est le cas des β -lactames, des quinolones et des aminoglycosides.

Parfois, ces antibiotiques n'arrivent jamais jusqu'à la membrane car ils sont piégés par l'alginate. En effet, cet exopolysaccharide (EPS), entoure la bactérie et se lie aux antibiotiques cationiques tels que les aminoglycosides (Nichols et al., 1988). Cet EPS sera décrit plus en détail dans le chapitre 2 de cette revue bibliographique.

P. aeruginosa comme toutes les bactéries Gram négatif, possède deux membranes : une membrane interne et une membrane externe, séparées par l'espace périplasmique. Cette structure hydrophobe est naturellement moins perméable aux petites molécules hydrophiles comme les nutriments.

La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (Cf Revue bibliographique – Chapitre 1 – Section VII.1.4) et de phospholipides où s'insèrent de nombreuses protéines comme les porines. Les porines sont des protéines transmembranaires formant des pores ou canaux protéiques permettant l'entrée des petits composés hydrophiles. Elles sont composées de feuillets- β et s'associent parfois en trimères. Chaque monomère est formé par des tonneaux- β transmembranaires. Les feuillets- β sont reliés entre eux par des boucles extracellulaires et périplasmiques, et des boucles spécifiques, situées au centre du tonneau, forment la zone de constriction de la porine. Le diamètre de la zone de constriction permet le passage de molécule de taille bien définie.

La porine majoritaire de *P. aeruginosa* est OprF. Elle est aussi appelée « porine générale » car le passage des molécules à travers son canal est non spécifique. Ainsi, des composés variés comme des petites molécules ioniques ou des polysaccharides d'une taille inférieure à 1,5 kDa, pénètrent dans la cellule par diffusion. OprF a aussi été décrite comme une protéine structurale importante dans l'intégrité cellulaire grâce à la forte interaction de son domaine périplasmique avec le peptidoglycane (Rawling et al., 1998). Elle est aussi impliquée dans la morphologie de la cellule, dans la survie en milieu faiblement osmotique (Rawling et al., 1998) ou encore dans la formation de biofilm (Cassin & Tseng, 2019).

P. aeruginosa contient d'autres porines spécifiques. Ce sont les cas des porines OprB, OprD, OprE, OprO, and OprP. Enfin, les porines OprM, OprN et OprJ participent au fonctionnement des pompes d'efflux. Ces pompes exportent les déchets toxiques du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Hancock & Brinkman, 2002; Samanta et al., 2018; Welte et al., 1995).

Comme les nutriments et autres petites molécules, les antibiotiques de nature hydrophile n'ont d'autre choix que de passer par les porines pour traverser la membrane externe. Pour se protéger, *P. aeruginosa* est capable de réduire le nombre de porines non spécifiques, pour les remplacer par des porines spécifiques, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane aux molécules toxiques (Tamber & Hancock, 2003). Cette adaptation est notamment responsable d'une résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines (Karsten Baumgart et al., 2010).

Comme évoqué précédemment, *P. aeruginosa* possède des pompes d'efflux qui contribuent largement à son antibiorésistance. Ces pompes sont des systèmes de transport membranaire exclusivement dédiés à l'efflux de molécules.

En fonction de leur structure, du nombre de domaines transmembranaires, de la source d'énergie utilisée pour l'export et des substrats efflués, les pompes d'efflux ont été classées en 6 grandes familles : la superfamille des ABC (adenosine triphosphate-binding cassette), la superfamille des MFS (major facilitator superfamily), la famille des MATE (multidrug and toxic compound extrusion), celle des SMR (small multidrug resistance), celle des RND (resistance

nodulation cell division), et enfin la famille des PACE (proteobacterial antimicrobial compounds efflux) (**Figure 5**) (Boulant et al., 2020; Du et al., 2018).

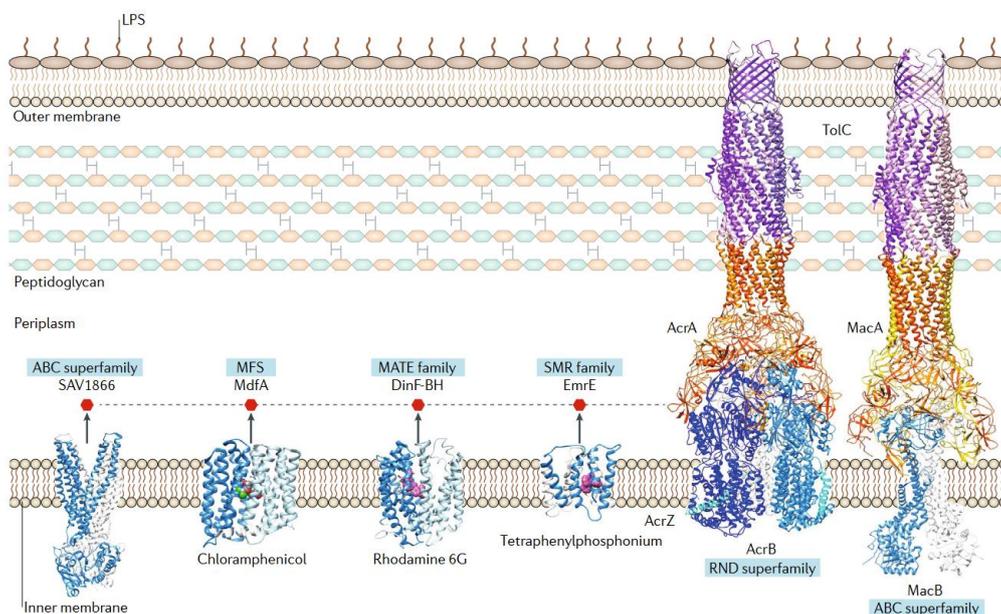


Figure 5 | Les différentes familles de pompes à efflux.

Le substrat est représenté par le point rouge. La famille PACE n'est pas représentée par manque de données structurales (Boulant et al., 2020).

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (adénosine triphosphate) (famille ABC). Les familles MFS, SMR, PACE, MATE et ABC sont présentes chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif, et sont uniquement localisées au niveau de la membrane (interne chez les Gram négatif). Les familles RND et ABC sont associées aux deux membranes et sont donc uniquement présentes chez les bactéries Gram négatif (Boulant et al., 2020).

Chez *P. aeruginosa*, les pompes les mieux caractérisées sont MexAB/OprM, MexXY/OprM, MexEF/OprN, MexJK/OprM et MexCD/OprJ, appartenant à la famille RND.

Les pompes d'efflux de la famille RND sont des systèmes tripartites transmembranaires qui traversent entièrement la paroi. Ils sont constitués d'une protéine de la membrane externe ou OMF (outer membrane fusion) (OprM, N, J), une protéine de fusion périplasmique ou MFP (membrane fusion protein) (MexA, X, E, J, C) et d'un transporteur inséré dans la membrane interne ou RND (MexB, Y, F, K, D) (**Figure 5**). Les gènes codant ces pompes sont souvent organisés en opérons (Cattoir, 2004; Putman et al., 2000).

De nombreuses données existent dans la littérature démontrant la forte implication de ces pompes d'efflux dans la multirésistance de *P. aeruginosa*. Les pompes MexAB/OprM et MexXY/OprM sont les deux pompes ayant un impact clinique majeur. Elles participent

notamment à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* face aux β -lactamines (sauf l'imipénème), aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones ou encore aux tétracyclines (Goli et al., 2018; Poonsuk & Chuanchuen, 2014). L'expression de *MexAB/OprM* est constitutive, c'est-à-dire que ces gènes sont constamment exprimés à un niveau basal, assurant une protection constante et stable (X.-Z. Li et al., 2015). L'expression basale de *MexXY/OprM* est, quant à elle, faible mais est augmentée lorsque la machinerie ribosomale est endommagée (T. Hay et al., 2013).

L'activité de ces pompes diminue une nouvelle fois la perméabilité membranaire et la concentration en antibiotique grâce à un transport actif vers l'extérieur de la cellule.

Enfin, *P. aeruginosa* possède une β -lactamase appelée AmpC. Le gène *ampC* est sous le contrôle d'un promoteur inductible en présence de β -lactamine. Sa localisation dans le périplasme n'est pas anodine. Elle hydrolyse les aminopénicillines et les céphalosporines, dès que celles-ci ont traversé la membrane externe (Juan et al., 2005).

Ces acteurs moléculaires sont aussi retrouvés dans la résistance acquise mais apparaissent mutés ou sont exprimés à des niveaux de transcription différents.

V.2 La résistance acquise

Contrairement à la résistance naturelle, la résistance acquise est la conséquence d'une pression de sélection par un antibiotique, menant à une population résistante de façon irréversible (J.-Y. Lee et al., 2016). Cette résistance peut être acquise *via* une mutation d'un gène porté par le génome, ou par acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal (Davies & Davies, 2010).

Certains gènes de résistance sont portés par des éléments génétiques mobiles dont les plasmides. Par transfert horizontal, ils se déplacent d'une bactérie à l'autre, conférant ainsi un avantage sélectif durant l'exposition à la molécule toxique. C'est le cas de l'îlot de pathogénicité PAPI-1 de la souche PA14, qui porte le régulateur PvrR qui contrôle le développement du biofilm et la résistance aux antibiotiques (He et al., 2004; X. Qiu et al., 2006). Les transferts horizontaux des gènes codant des β -lactamases, des méthylases et des carbapénémases ont ainsi très largement étendu la résistance aux β -lactamines (Poole, 2011). Ces enzymes inactivent l'activité des antibiotiques en les dégradant.

Dans certains cas, la présence d'une mutation au sein d'un système de régulation conduit à une activation élevée d'un promoteur et en conséquence à une résistance accrue. L'une des mutations la plus répandue est celle qui conduit à l'inactivation du répresseur de la transcription *ampD*. Le répresseur AmpD réprime la transcription du gène *ampC*, ce dernier se retrouve ainsi constamment exprimé même en l'absence d'antibiotique. Henrichfreise a

d'ailleurs montré que 73% des isolats cliniques testés dans son étude présentaient une mutation d'*ampD* et donc une surproduction d'AmpC (Henrichfreise et al., 2007).

De la même façon, une mutation sur les régulateurs transcriptionnels des pompes d'efflux MexAB/OprM, MexXY/OprM/A, MexCD/OprJ confère une importante résistance aux agents antimicrobiens (Kao et al., 2016; Lister et al., 2009). Par exemple, une mutation sur *mexT*, le régulateur des gènes codant la pompe MexEF/OprN, induit une surexpression de la pompe MexEF/OprN et une résistance aux fluoroquinolones. Le système MexXY/OprM est impliqué dans la résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa*, et serait, en cas d'hyperproduction, responsable du phénotype de type « imperméabilité » observé chez des souches cliniques (Choudhury et al., 2015).

P. aeruginosa peut aussi muter la porine par laquelle passe l'antibiotique. Ainsi, certains isolats cliniques résistants à l'imipénème (dérivé semi-synthétique de la thiénamycine) expriment peu la porine OprD (H. Li et al., 2012; Strateva & Yordanov, 2009; Trias & Nikaido, 1990) (H. Li et al., 2012), la seconde porine majoritaire de *P. aeruginosa*. Initialement, destinée au passage de petits peptides et d'acides aminés basiques, elle est aussi la porte d'entrée des carbapénèmes et en particulier l'imipénème (Epp et al., 2001; Gutiérrez et al., 2007).

V.3 La résistance adaptative

Cette résistance est de nature éphémère et reproductible car elle apparaît seulement durant l'exposition à un antibiotique spécifique et disparaît ensuite lorsque la bactérie n'est plus en contact avec l'antibiotique. Parmi les mécanismes connus et les mieux décrits on trouve, les mutations génétiques d'un répresseur et les mutations de la cible de l'antibiotique.

Parmi les mutations réversibles sur des gènes codant des répresseurs, celle sur le gène *nfxB* induit une surexpression des gènes codant la pompe d'efflux MexCD/OprJ. La sous-population bactérienne portant cette mutation est résistante aux fluoroquinolones (Hirai et al., 1987).

D'autres mutations ont pour conséquence une modification de la cible de l'antibiotique. Certains antibiotiques comme les aminoglycosides et les polymyxines ciblent le LPS (lipopolysaccharide) situé sur la face externe de la membrane externe. Pour contrer l'action de ces antibiotiques, de multiples mutations sur plusieurs gènes codant les protéines régulatrices PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB, CprR-CprS et ParR-ParS (Fernández et al., 2012), mènent à terme à une modification du LPS. Les mutations simultanées sur les protéines PhoP-PhoQ ou PmrA-PmrB ont notamment été trouvées chez des isolats cliniques résistants à la polymyxine B (Barrow & Kwon, 2009).

V.4 Les nouvelles approches thérapeutiques

À l'hôpital, l'apparition de PAMR complique la prise en charge des infections à *P. aeruginosa*. Compte-tenu de sa forte présence en milieu hospitalier et de sa versatilité, trouver de nouvelles approches thérapeutiques représente un enjeu de santé publique mais aussi un vrai défi pour la communauté scientifique.

La prévention est le premier levier dans la lutte contre les infections. Les mesures d'hygiène dans les établissements de santé sont coordonnées par le CTIN (comité technique national des infections nosocomiales) et par la cellule « Infections nosocomiales » du ministère de la santé.

Dans les années 1970, en dehors de la recherche de nouveaux antibiotiques, d'autres solutions ont été envisagées pour lutter contre *P. aeruginosa*, dont la vaccination. Malheureusement, malgré plus de 40 ans de recherche, il n'existe à ce jour aucun vaccin disponible sur le marché. Dans la plupart des cas, les essais entrepris n'ont pas dépassé le stade des essais cliniques pour cause de faible immunogénicité. Pour ceux qui ont dépassé ce stade ils n'ont, par la suite, pas confirmé leur efficacité lors d'essais cliniques. En 2022, une étude réunissant une équipe du service d'anesthésie de l'hôpital pour enfants de Boston et de chez AstraZeneca du Maryland, a été réalisée (Omar Faruk Shaikh et al., 2022). Ces deux équipes ont évalué les réponses immunitaires et l'efficacité protectrice de plusieurs vaccins chez des souris atteintes de pneumonie. Les vaccins consistaient en un mélange des protéines PopB/PcrH ou OprF/OprI, ou les deux. C'est la combinaison de PopB/PcrH et OprF/OprI qui a induit la protection la plus efficace contre *P. aeruginosa*. Ces résultats sont un premier pas encourageant dans la mise au point d'un vaccin.

À défaut, de trouver un vaccin, la recherche s'est penchée aussi sur l'immunothérapie. En effet, certains patients immuno-déficients infectés, sont incapables de supporter une réponse immunitaire induite par la vaccination. Le projet d'immunothérapie le plus prometteur a été le traitement oral par anticorps anti-*Pseudomonas* IgY produit en jaune d'œuf de poule. Les anticorps IgY augmentaient les populations de polynucléaires neutrophiles et de monocytes et semblaient inhiber l'attachement de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales (Thomsen et al., 2016). Ces recherches rentraient dans le projet appelé IMPACTT (Immunoglobulin IgY pseudomonas A clinical trial for cystic fibrosis treatment) qui fût financé par l'Europe jusqu'en 2016. Depuis la clôture du projet, aucune donnée supplémentaire n'a été publiée.

La phagothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de bactériophages a également été étudiée. Les bactériophages sont des virus qui utilisent toute la machinerie de la bactérie infectée pour créer de nouveaux virus jusqu'à la lyse de la cellule. En combinaison avec un traitement

antibiotique, ces bactériophages se sont montrés efficaces contre les biofilms de *P. aeruginosa* (Holguín et al., 2015; Jeon & Yong, 2019; Wright et al., 2009).

De nombreux essais de traitements ont donc été menés mais beaucoup se sont révélés inefficaces ou n'ont pas réussi à dépasser les phases cliniques. D'autres sont encore en cours et sont pour le moment au stade pré-clinique.

Cependant la recherche continue et de nombreux projets visant à lutter contre les infections à *P. aeruginosa* continuent d'émerger. En France, ces projets sont notamment financés par l'association « Vaincre La Mucoviscidose ». Grâce à ces financements, des nouvelles perspectives thérapeutiques voient le jour. Parmi celles-ci, le projet dirigé par Jean-Michel BOLLA (INSERM U1261, UMR MD1, Faculté de Médecine à Marseille) visait à faciliter l'action des antibiotiques grâce à l'utilisation de molécules chimio-sensibilisantes capables de diffuser efficacement dans le mucus respiratoire et dans les biofilms. Les études *in vitro* encourageantes ont montré que les composés polyamino-isoprényles sont capables de déstabiliser l'intégrité membranaire des bactéries à Gram négatif par une action membranotrope dose-dépendante qui induit l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (Troudi, 2022).

Le projet d'Isabelle Schalk visait quant à lui à pirater les systèmes bactériens d'assimilation du fer (un nutriment essentiel à la prolifération de *P. aeruginosa*) pour faciliter l'entrée d'antibiotiques dans la bactérie. En employant la stratégie du cheval de Troie, les antibiotiques sont « déguisés » chimiquement pour qu'ils soient reconnus par les voies d'assimilation du fer de la bactérie (Gasser et al., 2016; Perraud et al., 2022).

La difficulté à éradiquer les infections à *P. aeruginosa* montre combien cette bactérie est capable de s'adapter à son environnement. Pour garantir sa survie et sa prolifération, *P. aeruginosa*, déploie un arsenal important de facteurs de virulence. Certains sont responsables d'une dégradation rapide des tissus et d'une réponse inflammatoire exacerbée, caractéristiques d'une infection dite aigüe.

VI. Le cycle de l'infection respiratoire aigüe

L'infection aigüe est induite par des bactéries planctoniques, c'est à dire mobiles et isolées les unes des autres. Elles coopèrent néanmoins pour coloniser les tissus grâce à la production de métabolites secondaires appelés facteurs de virulence.

Le cycle de l'infection aigüe comporte les grandes étapes suivantes : *i)* Adhésion et colonisation, *ii)* Invasion cellulaire locale et *iii)* Dissémination épithéliale et systémique. Pour mener à bien chaque étape, *P. aeruginosa* dispose d'un arsenal de facteurs de virulence qui sont membranaires ou sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ces différents facteurs de virulence sont mobilisés en fonction de l'étape du cycle infectieux dans lequel *P. aeruginosa* se trouve. Les facteurs de virulence principaux associés à ces étapes sont représentés sur la **Figure 6**. Un même facteur de virulence peut être présent à chaque étape du cycle infectieux mais avec des rôles différents (adhésion, mobilité, échappement du système immunitaire, toxicité).

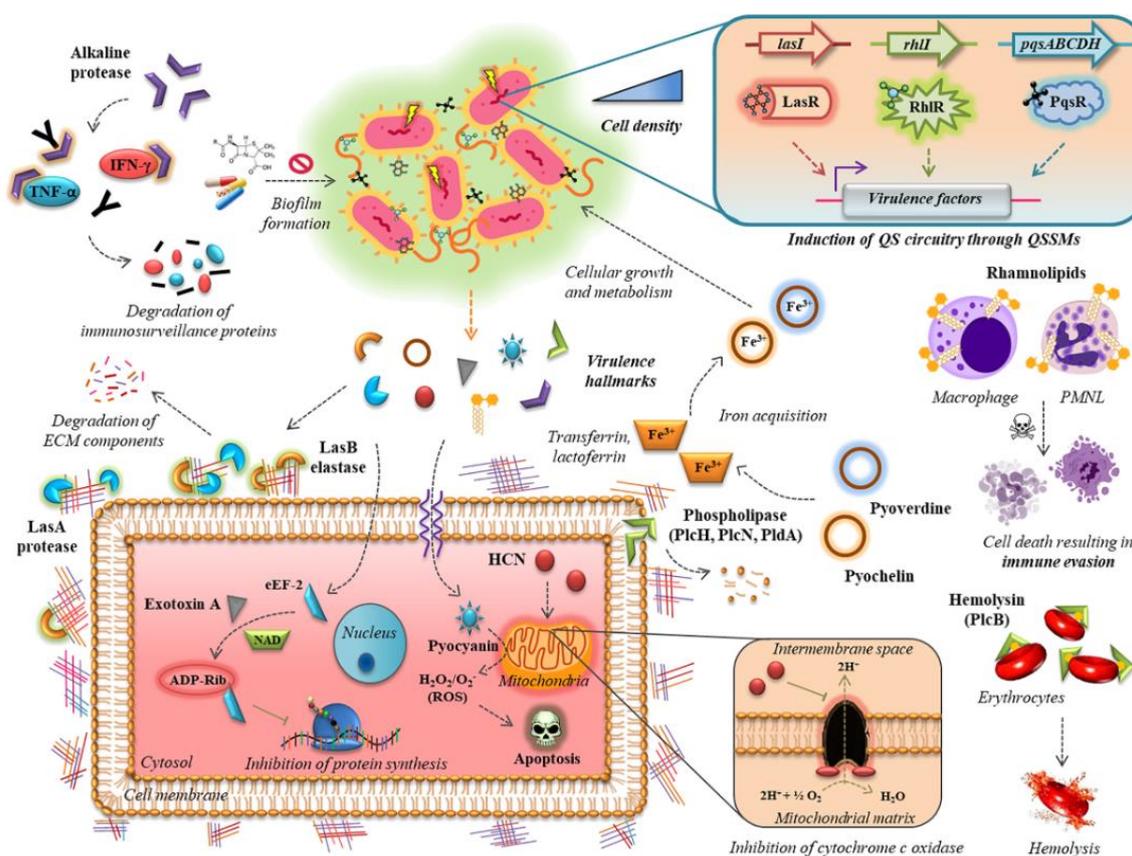


Figure 6 | Les mécanismes de virulence associés à la pathogenèse de *P. aeruginosa*.

Après avoir atteint un seuil critique (quorum), les systèmes de *quorum sensing* entraînent l'expression de différents facteurs de virulence. La protéase alcaline, les élastases et les protéases, les phospholipases et les rhamnolipides, stimulent la destruction des circuits d'immuno-surveillance de l'hôte, des composants de la matrice extracellulaire (ECM), des lipides membranaires, des cellules immunitaires

suite figure 6 : et des érythrocytes respectivement. La production de sidérophores, d'exotoxine A, de cyanure d'hydrogène (HCN) et de pyocyanine permet respectivement de chélater le fer des tissus hôtes, d'inhiber la synthèse des protéines, d'abroger la chaîne de transport d'électrons et d'induire l'apoptose. La formation de biofilms mucoïdes protège les cellules bactériennes des antibiotiques et des cellules immunitaires entrantes (Chadha et al., 2022).

VI.1 L'adhésion tissulaire

L'adhésion au tissu est l'étape essentielle pour initier l'infection. Préalablement évoquées dans la partie « *III. Un pathogène opportuniste* », les portes d'entrées dans l'hôte sont nombreuses. Ainsi, *P. aeruginosa* infecte plus facilement une personne dont les premières lignes de défense, représentées par la peau et les muqueuses, sont endommagées. Il est possible de retrouver le terme « d'adhérence opportuniste » pour décrire cette adhérence. Elle fait intervenir des facteurs de virulence regroupés sous le terme d'adhésines qui sont essentiellement associés à la membrane comme les *pili*, le flagelle et les lectines. Ces adhésines vont reconnaître des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules eucaryotes pour permettre dans un premier temps l'adhésion puis l'invasion.

VI.1.1 Les *pili* de type IV

Les *pili* sont des filaments constitués de sous-unité de piline A (PilA) de 5 à 8 nm de diamètre et plusieurs microns de longueur (Beaussart et al., 2014; Burrows, 2012) (**Figure 7**). Leur structure hélicoïdale leur confère des propriétés d'extension et de rétractation leur permettant d'assurer de nombreuses fonctions telles que la mobilité, l'adhésion ou la formation de biofilm. Les *pili* de type IV sont les adhésines majoritairement retrouvées lors de l'adhésion et en particulier lorsque l'épithélium du tractus respiratoire est endommagé. Une étude a montré que sur un épithélium respiratoire de chien partiellement endommagé, *P. aeruginosa* était seulement retrouvée sur les cellules exfoliées et n'adhérait pas sur les cellules saines (Hulbert et al., 1990) . L'hypothèse est que les cellules en cours de mort cellulaire seraient les seules à exposer ou exprimer les récepteurs reconnus par les adhésines de *P. aeruginosa*. Les *pili* de type IVa, IVb et Tad sont les trois types de *pili* de type IV retrouvés uniquement chez *P. aeruginosa* dont Tad qui est codé par l'îlot de pathogénicité PAPI-1.

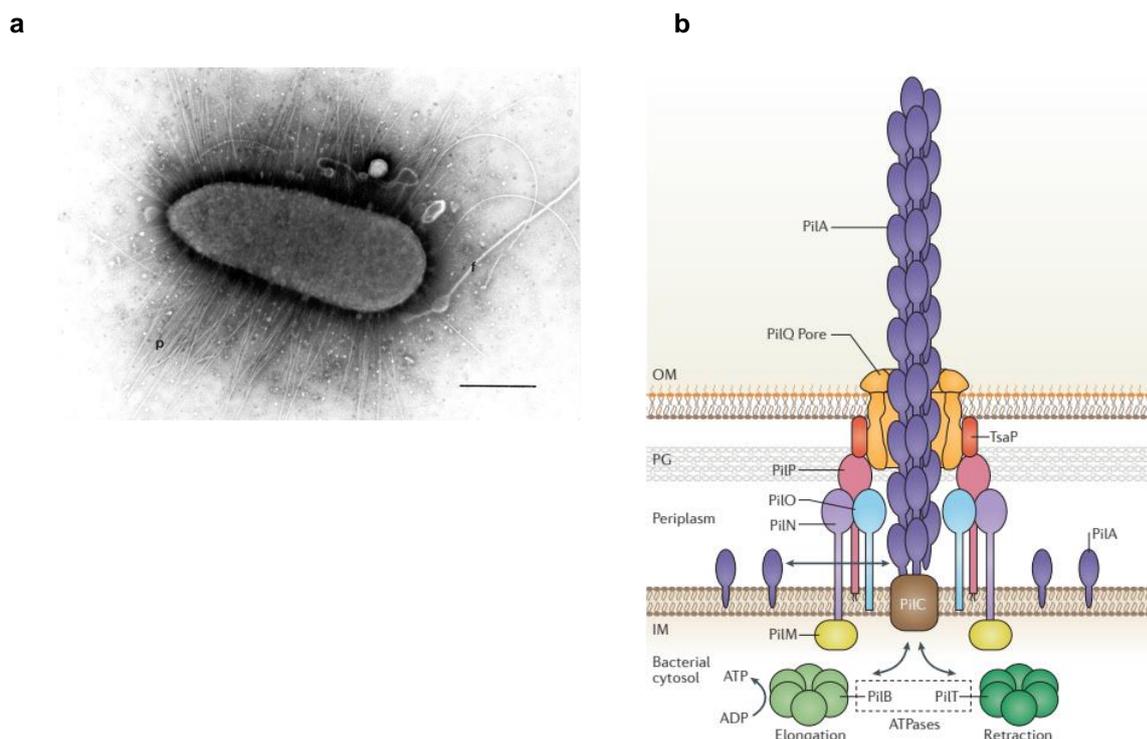


Figure 7 | Les appendices membranaires de *P. aeruginosa* et la structure du pilus de type IVa.

P. aeruginosa observée en microscopie à transmission électronique, échelle : 500 nm (P : pili ; F : flagelle) (Baldwin, 2001) (a). Structure du pilus de type IVa (IM : membrane interne, PG : peptidoglycane et OM : membrane externe) (Hospenthal et al., 2017) (b).

L'adhésion de la bactérie sur le pôle apical des cellules épithéliales respiratoires se fait *via* la partie C-terminale de la piline A et les récepteurs glycolipidiques des cellules respiratoires Asialo-GM1 (Comolli et al., 1999; Doig et al., 1988; Farinha et al., 1994; Giltner et al., 2006; Saiman & Prince, 1993). Ces récepteurs sont en forte abondance à la surface de l'épithélium respiratoire de patients atteints de mucoviscidose (Saiman & Prince, 1993). Toujours du côté apical, les N-glycanes sont également des récepteurs des *pili* (Bucior et al., 2012). Enfin, du côté basal, c'est l'adhésine PilY1, située au bout du *pilus*, qui interagit avec le motif RGD (motif arginine-glycine-acide aspartique) des intégrines (Johnson et al., 2011).

VI.1.2 Le flagelle

Le flagelle polaire (Figure 7a) est une structure filamenteuse de 15 à 20 μm de long qui participe activement à la mobilité bactérienne mais aussi à l'adhésion. Le flagelle possède une structure complexe composée d'environ 20 protéines formant le corps basal, le crochet et le filament. Le corps basal (« stator » et « rotor ») est ancré dans la double membrane et fournit l'énergie pour la rotation du flagelle. Le crochet (FlgE) sert de lien entre le corps basal et le filament. Ce dernier est composé de flagelline (FliC) et se termine par une coiffe protéique (FliD) (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013; Sampedro et al., 2015) (

Figure 8). Cette structure présente une forte homologie avec le système de sécrétion de type 3 (cf Revue bibliographique - Chapitre 1- Section VI.2.1.3).

En dehors de son rôle majeur dans la mobilité bactérienne, le flagelle permet l'adhésion sur des surfaces hydrophobes voire superhydrophobes (Bruzaud et al., 2015). Du côté cellulaire, FliC interagit avec les récepteurs Asialo-GM1 (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013) et le surfactant SP-A (Ketko et al., 2013). La flagelline est également un des principaux activateurs de la réponse immunitaire de l'hôte *via* les récepteurs de type Toll 5 (J. Zhang et al., 2003). FliD quant à elle interagit avec le récepteur MUC1 présent sur la mucine respiratoire qui tapisse l'épithélium pulmonaire (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013).

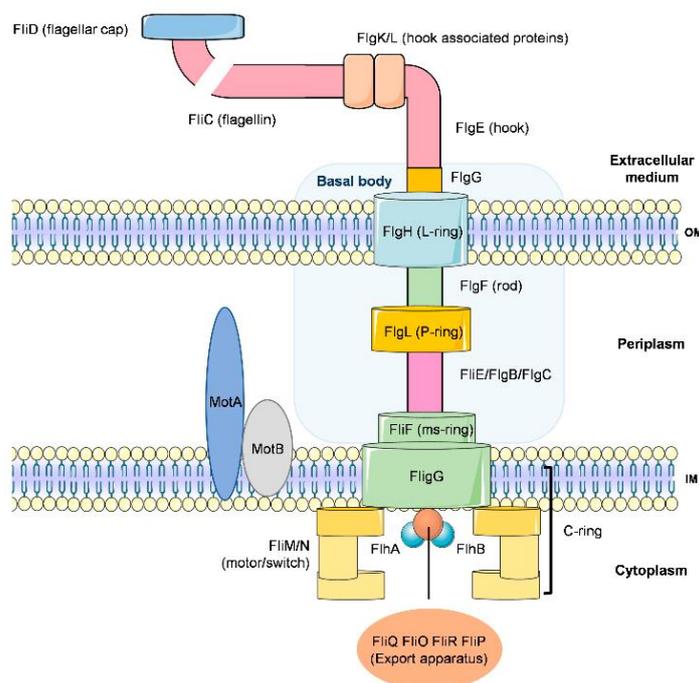


Figure 8 | Représentation schématique du flagelle de *P. aeruginosa*.
(T. De Sousa et al., 2021)

VI.1.3 Les lectines

Les lectines sont des protéines solubles qui se fixent sur des sucres localisés à la surface des cellules hôtes. *P. aeruginosa* possède deux lectines : LecA (PA-IL) et LecB (PA-IIL) qui se fixent respectivement sur le galactose et le fucose. Bien qu'elles aient été identifiées initialement dans le cytoplasme, elles sont présentes en grande quantité sur la membrane externe (Tielker et al., 2005). LecA facilite l'adhérence de *P. aeruginosa* sur l'épithélium intestinal et altère sa perméabilité, augmentant l'adsorption de l'exotoxine A (Laughlin et al., 2000). En plus de leur rôle dans l'adhésion, ces deux lectines possèdent aussi une activité cytotoxique sur les cellules épithéliales respiratoires. LecA diminue leur taux de croissance tandis que LecB inhibe le battement ciliaire *in vitro* (Adam et al., 1999). Le battement ciliaire est un mouvement mécanique qui permet d'évacuer le mucus qui tapisse naturellement les

voies respiratoires. L'un des rôles du mucus est de piéger les pathogènes, il est donc important de l'évacuer régulièrement pour éviter l'infection.

Enfin, elles sont en étroite relation avec d'autres facteurs de virulence. Ainsi, les lectines contribuent à l'attachement du biofilm sur les cellules épithéliales (Diggle et al., 2006; Tielker et al., 2005) et LecB participe à la biogénèse du *pilus* et à l'activité de la protéase IV (Sonawane et al., 2006).

VI.1.4 Le lipopolysaccharide

Le LPS est un élément essentiel dans la structure de la membrane car il compose la bicouche lipidique de la membrane externe (**figure 9**).

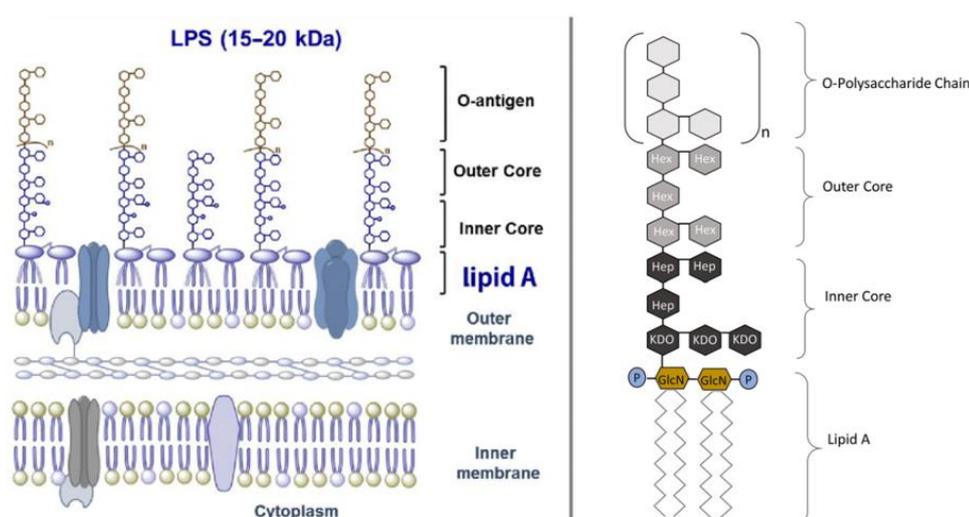


Figure 9 | Structure du LPS.

Le cœur lipidique contient une partie interne et une partie externe. La partie interne contient des sucres comme le L-glycérol-D-mano heptose (Hep) et du 3-déoxy-D-manno-acideoctulosonique (Kdo). La partie externe contient des hexasamines et des hexasoses (Hex). P : groupement phosphate. Figure modifiée à partir de (Mohammad & Thiemermann, 2021; Zamyatina, 2018).

Le LPS est divisé en trois parties. Le lipide A (ou endotoxine) qui permet l'ancrage dans la bicouche lipidique, un polysaccharide appelé antigène-O ou OPS (O polysaccharide) et un cœur oligosaccharidique reliant le lipide A et l'OPS (**Figure 9**) (J.S. Lam et al., 1999; Rocchetta et al., 1999).

Outre son rôle de barrière physique entre l'environnement et la cellule bactérienne, le LPS est aussi impliqué dans l'adhésion bactérienne.

Plus précisément, le lipide A se fixe sur les récepteurs eucaryotes CD14 et Type Toll-4 localisés à la surface des macrophages. Le récepteur Type Toll-4, à la différence du CD14, a été identifié comme étant le récepteur spécifique pour le LPS (Poltorak et al., 1998; Rhee, 2014). Une fois le lipide A fixé, les macrophages vont sécréter des cytokines proinflammatoires comme IL-1 (interleukine), IL-6, IL-8 et le TNF α (tumour necrosis factor α). Ces cytokines vont

à leur tour se fixer sur des récepteurs, menant à la production de médiateurs de l'inflammation. Du point de vue physiologique, l'apparition de ces médiateurs se traduit par de la fièvre et une hypotension chez les patients, à la suite de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à la vasodilatation. En cas d'infection, la lyse des bactéries va libérer en abondance le LPS qui va activer les macrophages. En conséquence, les médiateurs sont libérés en excès provoquant des dommages irréversibles et un choc endotoxique, pouvant mener au coma et à la mort du patient (Hamann et al., 2005).

L'antigène-O est la partie antigénique du LPS qui assure, entre autres, la résistance à la phagocytose. C'est aussi la partie la plus variable entre les souches (Lam et al., 1989). Certaines bactéries possèdent un LPS dépourvu d'un antigène-O conduisant à un phénotype « rough » car les colonies ont un aspect rugueux sur gélose. À l'inverse, celles qui possèdent un LPS complet ont un phénotype « smooth » car les colonies apparaissent lisses sur gélose. Les bactéries « rough » sont plus facilement phagocytées et moins virulentes que leurs congénères « smooth » (Liang-Takasaki et al., 1982).

Des études plus récentes ont montré que les isolats de patients atteints de mucoviscidose qui possédaient un phénotype « rough » étaient aussi mucoïdes. L'équipe de Goldberg a démontré que ces deux phénotypes étaient inversement régulés par le régulateur AmrZ. La longueur de l'antigène-O est dépendante d'une protéine appelée Wzz2. Chez les souches cliniques mucoïdes qui possèdent un antigène-O très court, donc « rough », l'expression de Wzz2 est très faible comparée à celle des isolats non mucoïdes. L'expression de *wzz2* est en fait inhibée par le régulateur de la transcription AmrZ présent en abondance chez les souches mucoïdes (Cross & Goldberg, 2019).

VI.2 L'invasion cellulaire locale

La réussite de l'invasion réside dans la production par *P. aeruginosa* d'enzymes et de toxines. Ces protéines sont capables de contrer les barrières physiques, d'endommager les cellules hôtes et de résister à la phagocytose et aux mécanismes de défenses de l'hôte. Pour se maintenir dans le tissu, la stratégie majeure adoptée par la bactérie est la sécrétion de facteurs de virulence pour détruire les cellules de l'hôte.

VI.2.1 La sécrétion des facteurs de virulence par les systèmes de sécrétion

Les facteurs de virulence, pour se retrouver dans le milieu extracellulaire, doivent traverser la membrane interne, le périplasme et la membrane externe. Pour cela, ils utilisent les systèmes de sécrétion, apparentés à des « nanomachines armées » ancrées dans la membrane de *P. aeruginosa*. Selon les protéines sécrétées, la bactérie peut capturer des nutriments essentiels,

échapper au système immunitaire, perturber les signaux cellulaires de l'hôte, se répliquer dans les macrophages ou tuer les cellules hôtes. Ces systèmes sont donc indispensables à la survie de *P. aeruginosa*.

Certain de ces systèmes de sécrétion présentent de fortes homologues de structure avec certains appendices bactériens comme les *pili* de type IV et le SST2 (système de sécrétion de type 2), le flagelle et le système SST3 ou la queue du bactériophage et le SST6.

Au total, 9 systèmes de sécrétion ont été trouvés chez les bactéries. Certains sont uniquement présents chez les bactéries Gram positif, comme le SST7 chez *Mycobacterium tuberculosis*.

À ce jour, cinq SST ont été identifiées chez *P. aeruginosa* : le SST1, 2, 3, 5 et 6. Selon le système, la protéine est sécrétée dans l'environnement extracellulaire (SST1, 2 et 5) ou injectée dans le cytoplasme de la cellule cible qui peut être procaryote ou eucaryote (SST3 et 6) (**Figure 10**).

VI.2.1.1 Le système de sécrétion de type 1

Le SST1 sécrète les protéines en une seule étape c'est-à-dire du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Il est divisé en trois : une protéine de la membrane externe, un ABC transporteur dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire à la sécrétion et une seconde protéine de la membrane interne (Delepelaire, 2004; Holland et al., 2005).

P. aeruginosa possède deux SST1. Le premier appelé Apr sécrète la protéase alcaline AprA et la protéine AprX de fonction inconnue (Duong et al., 2001; Guzzo et al., 1991). AprA participe à l'échappement du système immunitaire en dégradant les protéines du complément (C1q, C2 et C3), les anticorps et les cytokines (IFN- γ , TNF- α et IL-6) (Laarman et al., 2012). Toujours pour échapper aux défenses de l'hôte, elle est capable de dégrader la flagelline FliC fortement immunogène et ainsi éviter la phagocytose (Bardoel et al., 2011). Elle a aussi une activité cytotoxique en dégradant la fibronectine et la laminine qui sont des composants de l'endothélium (Galdino et al., 2017). Le second système appelé Has sécrète HasAp, un hémophore qui chélate les ions de l'hème de l'hémoglobine (Létoffé et al., 1998; Wandersman & Delepelaire, 2004).

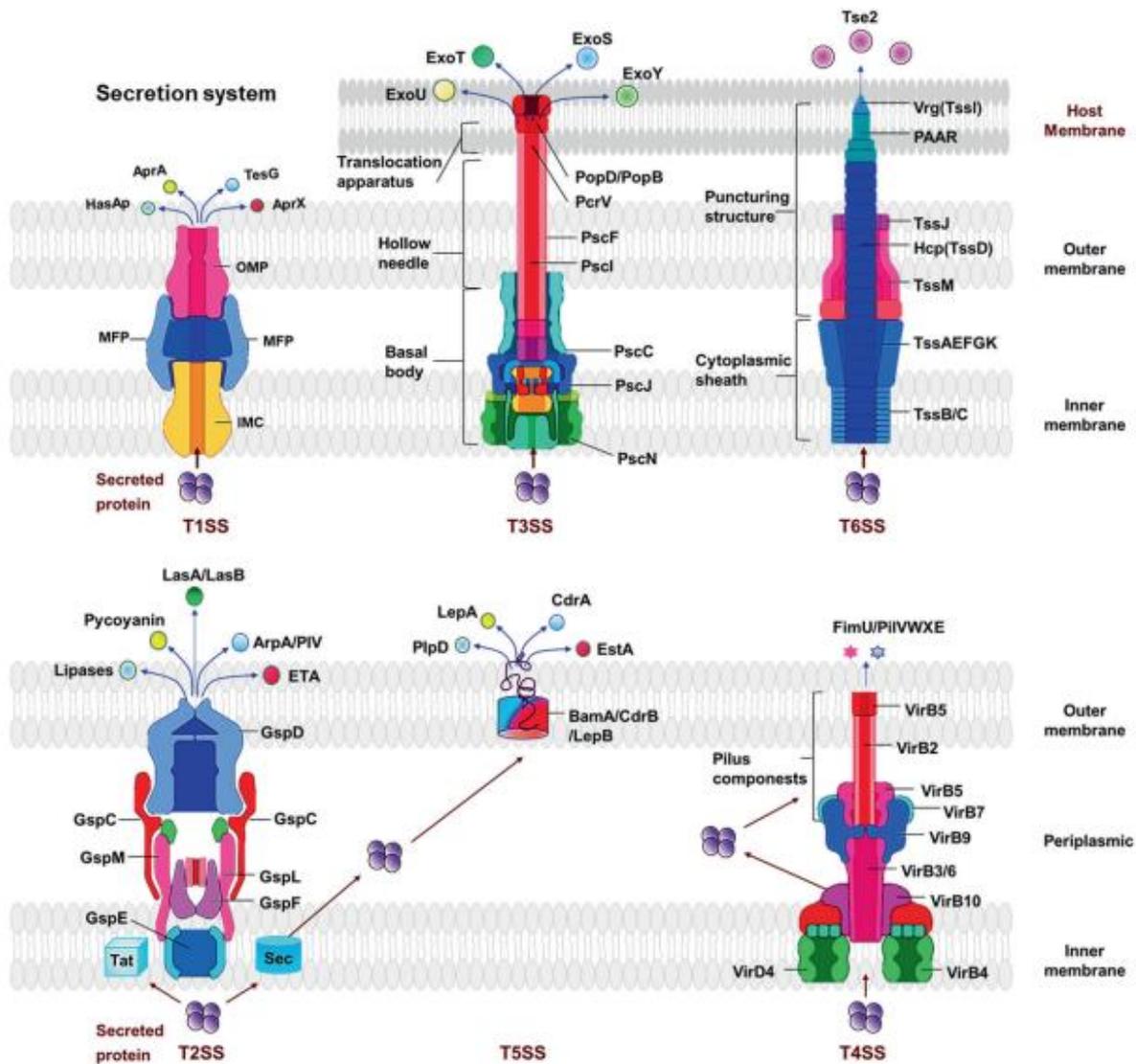


Figure 10 | Les systèmes de sécrétion et leurs protéines effectrices associées chez *P. aeruginosa*.

Les systèmes de sécrétion sont divisés en deux familles : la sécrétion en une étape (SST1, SST3, SST6) et la sécrétion en deux étapes (SST2, SST5). Les protéines de la première famille sont directement expulsées dans le milieu extracellulaire ou dans le cytoplasme de la cellule cible. Les protéines de la seconde famille, sont d'abord envoyées dans le périplasma par le système Sec ou Tat puis traversent la membrane externe par leur système de sécrétion respectif (Qin et al., 2022).

VI.2.1.2 Le système de sécrétion de type 2

Le SST2 sécrète les protéines dans le milieu extracellulaire en deux temps et en collaboration avec les systèmes Tat (twin-arginine translocation) et Sec (general secretory) situés dans la membrane interne. Selon la nature du peptide signal situé en N-terminal, les protéines passent soit par le système Tat soit par le système Sec pour se retrouver d'abord dans le périplasma (Gimenez et al., 2018; Voulhoux et al., 2001). La seconde étape est le clivage du peptide signal et l'adoption de la conformation tridimensionnelle avant le passage dans le système de sécrétion. Il existe plusieurs SST2 selon les souches de *P. aeruginosa*. La souche PA14 en

possède deux : le Xcp (extracellular protein) (Bally et al., 1991) et le Hxc (homologue xcp) (Bally et al., 2002). Ces deux SST2 sont composés de 4 parties : un complexe dans la membrane externe, une plateforme insérée dans la membrane interne, un système d'hydrolyse d'ATP et un pseudopilus.

Le système Xcp sécrète un grand nombre de substrats dont les élastases (LasA et LasB), les lipases (LipA et LipC), l'aminopeptidase PaAP, l'alkaline phosphatase PhoA, les phospholipases (PlcB, PlcH et PlcN) et les exotoxines (Cianciotto & White, 2017). Les rôles de certaines de ses protéines sont détaillés dans les sous-parties ci-dessous mais, dans l'ensemble, elles participent à la dégradation des tissus et des jonctions cellulaires pour faciliter l'invasion.

Le système Hxc est quant à lui activé pour garantir la survie dans un environnement pauvre en phosphate *via* les phosphatases alcalines LapA, LapC et PstS (Bally et al., 2002).

VI.2.1.2.1 L'exotoxine A

Parmi les protéines sécrétées, l'exotoxine A (ExoA ou ToxA) est la plus toxique. Elle fait partie de la famille des toxines A-B et sa sécrétion fait suite à une carence en fer. ExoA, grâce à son domaine B (binding) se lie aux cellules eucaryotes *via* les récepteurs CD91 ou α 2-macroglobuline conduisant à son endocytose. Après son internalisation, elle change de conformation, ce qui active son activité nécrosante autour de la zone de colonisation (Martinez et al., 2015). En effet, son domaine A (activity) en tant qu'ADPRT (adénosine diphosphate-ribosyltransférase) transfère une ADP-ribose (adénosine di-phosphate) sur l'EF2 (elongation factor 2) ce qui bloque la synthèse des protéines et entraîne la nécrose de la cellule (Pavlovskis et al., 1978). Enfin, ExoA active deux caspases impliquées dans l'apoptose (Iwański et al., 2023) et la diminution de la réponse immunitaire (Schultz et al., 2000).

VI.2.1.2.2 Les élastases LasB et LasA

LasB, aussi appelée « pseudolysine » est une métalloprotéase zinc-dépendant de la famille des thermolysines (Toder et al., 1994). Dans le cytoplasme, la protéine est d'abord une préproélastase de 54 kDa (kiloDalton) composée d'un pré-peptide en N-terminal comme molécule signal, d'un propeptide et d'une élastase en C-terminal (Bever & Iglewski, 1988; Thayer et al., 1991). Elle traverse d'abord la membrane interne *via* le système Sec grâce au pré-peptide, qui sera dans le même temps clivé. La protéine devenue une proélastase (51 kDa) se replie sous sa forme active grâce au propeptide que joue le rôle de chaperonne (Braun et al., 2001). Ce dernier est ensuite retiré par clivage auto protéolytique mais reste accroché de façon non covalente à l'élastase mature (33 kDa) (Kessler et al., 1988). Une fois le complexe sécrété par le SST2 Xcp, le propeptide, qui joue le rôle d'inhibiteur de l'élastase se dissocie donnant une élastase catalytiquement active (Braun et al., 1998; Kessler et al., 1988).

LasB joue un rôle significatif dans la virulence et la protection de la bactérie. Il a été montré qu'une souche délétée du gène *lasB* était plus sensible à la phagocytose et présentait une virulence diminuée (Kuang et al., 2011).

En premier lieu, LasB dégrade l'élastine, une protéine essentielle qui donne l'élasticité à l'épithélium respiratoire, le collagène et la laminine ce qui perturbe les jonctions serrées (Azghani & Peterson, 2000; Beaufort et al., 2013; Nomura et al., 2014). Elle cible aussi le système immunitaire en clivant les protéines du surfactant A et D, les immunoglobulines et les cytokines (TNF- α , IFN- β , IL-6 et IL-12) (Kuang et al., 2011; Nomura et al., 2014; Saint-Criq et al., 2018). Elle a aussi la capacité de perturber le processus de réparation des lésions tissulaires en réduisant la migration cellulaire et la cicatrisation (R. A. Miller et al., 1996). Le processus de coagulation est aussi impacté car elle clive des facteurs de coagulation comme le fibrinogène et la thrombine (Casilag et al., 2015). En outre, son activité de clivage libère des nutriments nécessaires à la multiplication de *P. aeruginosa* (Everett & Davies, 2021).

LasA est aussi une métalloprotéase zinc-dépendant. Son processus de sécrétion est similaire à celui de LasB (Grande et al., 2007; Toder et al., 1994). LasA est d'abord connue pour son activité staphylolytique qui touche les liaisons peptidiques du peptidoglycane de *S. aureus* (Kessler et al., 1993). Cette activité donne un avantage non négligeable à *P. aeruginosa* lors de la colonisation des poumons de patients atteints de mucoviscidose généralement primo-colonisés par *S. aureus*. LasA est aussi impliquée dans la dégradation de l'élastine mais améliore surtout l'activité de LasB (Kessler et al., 1998; Peters & Galloway, 1990; Toder et al., 1994).

VI.2.1.2.3 CbpD et son produit de clivage LasD

La protéine CbpD (chitin-binding protein D) se lie à un polysaccharide appelé chitine présent dans les parois cellulaires des mollusques, crustacés et insectes. Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, CbpD subit plusieurs clivages par LasB pour donner à terme une protéine appelée LasD (Folders et al., 2000; Park & Galloway, 1995). LasD possède une activité staphylolytique (Folders et al., 2000) et joue un rôle dans l'activation de LasA (Park & Galloway, 1995).

VI.2.1.2.4 Les phospholipases C

L'activité enzymatique des phospholipases est garantie grâce aux ions zinc. Les trois phospholipases C produites par *P. aeruginosa* sont PlcH, PlcN et PlcB. PlcH et PlcN dégradent les phospholipides de façon non spécifique alors que PlcB est spécifique à la dégradation de phosphatidyléthanolamine. Les membranes cellulaires eucaryotes et la signalisation de l'hôte sont donc les cibles de ces facteurs de virulence. PlcH est largement impliquée dans la pathogénicité de la bactérie lors des infections pulmonaires aiguës. En effet, la mutation du

gène induit une diminution de la virulence chez la souche PAO1. PlcH semblerait aussi agir en synergie avec les rhamnolipides pour dégrader les phospholipides et les jonctions serrées.

VI.2.1.2.5 La pyocyanine

La pyocyanine est le pigment responsable de la couleur bleu-vert de *P. aeruginosa*. Ce métabolite secondaire de la famille des phénazines est produit durant la phase stationnaire de croissance par une succession des réactions enzymatiques (Rada & Leto, 2013). La pyocyanine possède un cycle rédox qui peut être réduit par le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). La forme réduite de ce pigment réagit ensuite avec l'oxygène produisant des ROS (reactive oxygen s

pecies) comme le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Par dismutation, l'anion superoxyde devient du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Davis & Thornalley, 1983). Au contact des cellules eucaryotes, les ROS provoquent un stress oxydatif se traduisant, entre autres, par une oxydation des protéines et de l'ADN et une peroxydation des lipides. Le système immunitaire est aussi une des cibles de la pyocyanine *via* une induction de l'apoptose des neutrophiles (W. Lee et al., 2005) et une inhibition de la prolifération des lymphocytes (Ran et al., 2003).

VI.2.1.3 Le système de sécrétion de type 3

Ce système forme une aiguille qui permet l'injection de protéines directement dans le cytoplasme de la cellule cible eucaryote. Les SST3 ont été classés en fonction de leur cible. Les SST3 Ysc, InvMxi-Spa et Ssa-Esc ciblent des cellules animales tandis que deux SST3 Hrp ciblent les cellules végétales.

Celui de *P. aeruginosa* fait partie de la famille Ysc et participe très largement à sa pathogénicité durant l'infection aigue (A. R. Hauser, 2009). La structure et la régulation de ce système sont si complexes qu'elles nécessitent la transcription de 36 gènes regroupés sur 5 opérons (Frank, 1997). La structure du SST3 est divisée en 3 parties : un corps basal, une aiguille de 60 à 80 nm de long et 7 nm de large, et un translocon (Quinaud et al., 2005). Ce dernier, constitué de PopB, PopD et PcrV, forme un pore au niveau de la membrane des cellules cibles pour permettre l'entrée d'exotoxines appelés ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.

Les deux premières sont homologues (75% d'identité au niveau de leurs séquences protéiques) et ont une double activité. Une activité GAP (GTPase activating protein) en C-terminal qui active les protéines G de la famille des GTPases Rho et altère le cytosquelette d'actine. En N-terminal, l'activité ADPRT est dépendante de la présence de FAS (factor activating exoenzyme S), un cofacteur eucaryote de la famille 14-3-3. Il faut noter que l'activité ADPRT d'ExoT ne représente que 0.2% de celle d'ExoS. L'activité ADPRT d'ExoS inhibe les voies de transduction des signaux et dépolymérise les filaments d'actine tandis que celle

d'ExoT inhibe la migration cellulaire et le phénomène d'arrondissement cellulaire (Dean, 2011).

L'ensemble des souches de *P. aeruginosa* possède le gène *exoT* et environ 72% d'entre elles possèdent en plus le gène *exoS*. Il a été montré qu'ExoS confère un avantage non négligeable dans la virulence car elle est directement impliquée dans la destruction des tissus pulmonaires et dans la dissémination (Shaver & Hauser, 2004).

ExoU est considérée comme la plus cytotoxique car elle est associée à 90% à des infections pulmonaires sévères et à des septicémies mortelles. Son activité PLA₂ (phospholipase A₂) détruit de manière irréversible les membranes des cellules. Cette activité, lorsqu'elle touche les phagocytes, permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire (Shaver & Hauser, 2004).

Des études menées sur des souches cliniques et environnementales, ont montré que les gènes *exoU* et *exoS* n'étaient quasiment jamais retrouvés dans le même génome (Feltman et al., 2001) En sachant qu'*exoU* est présent sur l'îlot de pathogénicité PAPI-2, il est supposé que le gène *exoS* est excisé pour permettre l'insertion de l'îlot (Kulasekara et al., 2006).

ExoY via son activité adénylate cyclase, augmente la quantité de plusieurs seconds messagers dont l'AMPc intracellulaire. En conséquence, les filaments d'actine sont désassemblés de façon irréversible, les cellules se nécrosent et l'intégrité de la barrière endothéliale est compromise (Balczon et al., 2013; Cowell et al., 2005; Sayner et al., 2004).

En 2015, deux nouveaux effecteurs ont été découverts : PemA et PemB (Burstein et al., 2015).

La sécrétion de l'ensemble de ces protéines nécessite un signal environnemental qui correspond au contact avec les cellules cibles médié par les *pili*. De plus, les protéines possèdent un peptide signal et sont non repliées lors de leur transport. C'est pourquoi elles possèdent toutes une protéine chaperonne qui les maintient dans un état compétent. SpcS transporte ExoS et ExoT tandis que SpcU transporte ExoU (Finck-Barbançon et al., 1998; Gendrin et al., 2012). À ce jour, aucune chaperonne n'a été découverte pour ExoY (Teixeira-Nunes et al., 2022).

VI.2.1.4 Le système de sécrétion de type 5

Parmi l'ensemble des voies de sécrétion décrites jusqu'à présent, celle utilisant le SST5 est la plus simple. Dans un premier temps, la protéine traverse la membrane interne par le système Sec puis la membrane externe par un transporteur (le SST5). Une fois sécrétées, les protéines restent associées à la face externe de la membrane ou sont libérées dans le milieu extracellulaire après clivage protéolytique. Il existe deux types de transporteurs : les auto-transporteurs (SST5d, SST5a et SST5c) et la voie de sécrétion à deux partenaires (TPS aussi appelé SST5b) (Bernstein, 2019; Dautin & Bernstein, 2007; Henderson et al., 2004).

Concernant les protéines sécrétées par SST5a, EstA est pour le moment la seule caractérisée. EstA, localisée sur la face externe de la membrane externe, est importante dans la production de rhamnolipides, dans la mobilité et dans la formation de biofilm (Wilhelm et al., 1999, 2007). Un autre facteur de virulence, appelé PlpD est quant à lui sécrété par le SST5d. Il présente une activité lipase (Banerji & Flieger, 2004).

Seules quelques protéines du SST5b sont actuellement caractérisées dont LepA-LepB et CdrB-CdrA. LepB et CdrB sont des transporteurs ancrés dans la membrane externe. LepA est une protéase impliquée dans les réponses inflammatoires et immunitaires tandis que CdrA favorise la formation de biofilm et l'auto-agrégation bactérienne en culture liquide (Borlee et al., 2010; Kida et al., 2008). Des précisions sur le rôle de CdrA seront apportées dans le chapitre 2.

VI.2.1.5 Le système de sécrétion de type 6

Le système de sécrétion de type 6 est le dernier découvert (Mougous et al., 2006). Comme pour le SST2, les protéines sont sécrétées directement dans la cellule hôte eucaryote ou bactérienne (Russell et al., 2014). Ainsi, posséder le SST6, donne un avantage non négligeable dans le cadre de la compétition bactérienne dans un environnement polymicrobien.

Le SST6 est formé d'une plateforme sur laquelle vient s'appuyer une gaine contractile, elle-même située au sein d'un complexe transmembranaire. La gaine se rétracte au sein du tube à l'image d'un arc tendu avec une flèche puis est propulsée en direction de la cellule cible pour transloquer les protéines (Russell et al., 2014; Zoued et al., 2014).

Chez *P. aeruginosa*, 3 loci codent les composants de ce système : H1-SST6, H2-SST6 et H3-SST6 (Hood et al., 2010; Mougous et al., 2006). Le H1-SST6 est aujourd'hui très bien connu contrairement aux H2-SST6 et H3-SST6. Les protéines Hcp (hemolysin coregulated protein) et Vgr (valine-glycine repeat protein) sont à la fois, les éléments structuraux qui forment respectivement la gaine et la pointe perforante et les effecteurs de ce système.

Trois protéines nommées Tse1, Tse2 et Tse3 provenant de H1-SST6, ont pour cibles les bactéries concurrentes. Tse1 et Tse3 sont des amidases qui dégradent le peptidoglycane, et Tse2 bloque la croissance des bactéries par son action bactériostatique (Whitney et al., 2014). D'autres effecteurs, cette fois ci codés par le H2-SST6, ciblent les cellules eucaryotes comme VgrG2b. Il semble remodeler le pôle apical des cellules *via* l'actine pour garantir la colonisation de *P. aeruginosa* (Sana et al., 2015).

Enfin, l'effecteur PldB, codé par le H3-SST6, cible le périplasme des bactéries concurrentes (Jiang et al., 2014).

Le SST6 est en étroite collaboration avec le SST3 pour réguler à la fois les réponses de l'hôte (apoptose et réponse inflammatoire) et celles des bactéries (colonisation, mobilité, formation de biofilm et compétition bactérienne). L'alternance d'activité entre le SST3 et SST6 est directement contrôlée par RtcB, un régulateur de la traduction impliqué dans la colonisation et la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Dadashi et al., 2021).

Le SST6 est donc un puissant système utilisé par la bactérie pour éradiquer les bactéries concurrentes mais aussi les cellules eucaryotes dans le but de garantir sa colonisation.

VI.2.2 Les sidérophores pour la capture du fer

Le fer est un nutriment indispensable à la croissance de *P. aeruginosa*. Il lui est donc nécessaire de puiser dans une source riche ou contenant du fer pour répondre à ses besoins. Les liquides physiologiques de l'hôte comme l'hème en sont riches. En revanche, ce fer est lié à des protéines chélatrices comme les transferrines et les lactoferrines qui le rendent très peu soluble et donc difficile d'accès. Pour rivaliser avec ces protéines chélatrices et capturer ce fer, *P. aeruginosa* a développé différents mécanismes dont la production de sidérophores.

Les sidérophores sont des petites molécules libérées dans le milieu extracellulaire qui, en se chélatant au fer, forme un complexe qui sera ensuite reconnu par les récepteurs de la membrane externe de la bactérie. *P. aeruginosa* sécrète deux sidérophores : la pyochéline et la pyoverdine. La pyoverdine possède nettement plus d'affinité pour le fer que la pyochéline. La pyoverdine, de couleur jeune-vert, est sécrétée par une pompe d'efflux nommée PvdRT-OpmQ. Cette sécrétion est consommatrice d'énergie, c'est pourquoi elle n'intervient que lors d'une forte carence en fer (**Figure 11**).

Le complexe pyoverdine-fer, interagit avec les récepteurs FpvA et FpvB pour traverser la membrane externe. Dans le périplasme, le complexe est transporté par FpvC et l'ion ferrique est réduit par une réductase de la membrane interne appelée FpvG. Son activité est d'ailleurs maximale en présence de FpvH, FpvJ et FpvK. Récemment, il a été montré que l'ensemble de ses protéines forme un « méga complexe » qui participe à la réduction du fer. Après la réduction, l'ion ferreux, toujours complexé à la pyoverdine est transporté jusqu'à FpvDE, un ABC transporteur qui permet le passage de cet ion dans le cytoplasme. Enfin, la pyoverdine est transportée par FpvF jusqu'à la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ pour être réutilisée.

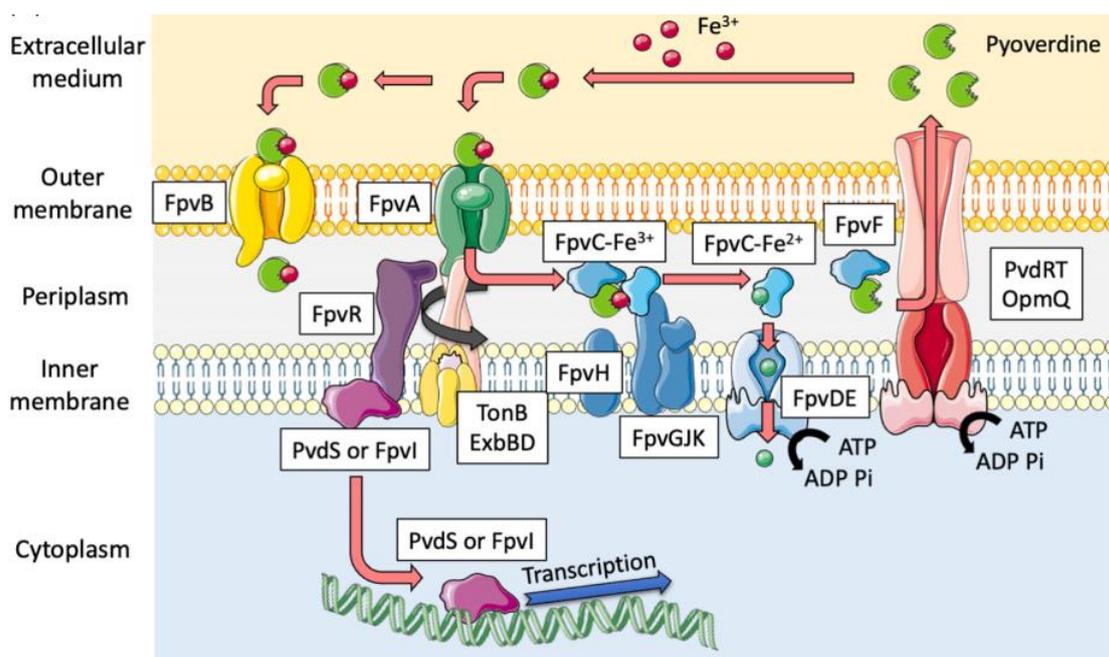


Figure 11 | Mécanisme de capture du fer par la pyoverdine et régulation des gènes associés. (Schalk & Perraud, 2022).

L'interaction entre l'ion et FpvA, change la conformation de l'anti-sigma FpvR ce qui libère deux facteurs sigma nommés PvdS et Fpvl. Les facteurs sigma/anti-sigma chez les bactéries peuvent être comparés à des boutons ON/OFF. Si les facteurs sigma sont emprisonnés avec leur anti-sigma alors la transcription des gènes associés n'a pas lieu. À l'inverse, si le facteur sigma est libre, il active la transcription des gènes. Les facteurs sigma sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques dont la virulence, le biofilm, la détection de signaux environnementaux, l'antibiorésistance ou encore l'adaptation. Les facteurs sigma PvdS et Fpvl activent la transcription des gènes en rapport avec la capture du fer comme *fpvA* et les gènes de biosynthèse de la pyoverdine mais aussi certains codant des facteurs de virulence comme l'exotoxine A (Schalk & Perraud, 2022).

VI.3 La dissémination épithéliale et systémique

La dissémination à travers l'épithélium se fait très rarement par internalisation de la bactérie bien que quelques études aient montré que *P. aeruginosa* pouvait s'internaliser (A. R. Hauser et al., 1998; Kroken et al., 2022; Malet et al., 2022; Plotkowski et al., 1999; Sana et al., 2012, 2015).

En 2016, Golovkine et son équipe sont les premiers à observer les phénomènes de propagation bactérienne par microscopie en temps réel (Golovkine et al., 2016). Dans un premier temps, les bactéries adoptent une propagation paracellulaire c'est-à-dire une migration du côté apical vers le côté basal des cellules. Cette migration mobilise les *pili*, le

flagelle et le SST3 pour dégrader progressivement les jonctions serrées. Les bactéries, une fois arrivée au côté basal, effectuent un déplacement radial c'est à dire sous la couche de cellules. L'injection de toxines, par le SST3 provoquent une rétractation et un détachement des cellules favorisant la propagation rapide des bactéries. Les bactéries forment des « radeaux » sous la couche cellulaire et se déplacent de façon synchronisée grâce à leurs *pili*. Cette étude a aussi montré qu'il suffit du passage d'une seule bactérie par une brèche pour que toutes les autres bactéries suivent massivement le même chemin jusqu'à la destruction de l'épithélium.

L'épithélium sérieusement endommagé par tous ces facteurs de virulence devient la porte d'entrée de la bactérie pour atteindre la circulation sanguine. La dissémination sanguine est une infection généralisée appelée septicémie qui peut provoquer un choc endotoxinique menant au coma puis à la mort du patient.

Dans les infections systémiques, *P. aeruginosa* pénètre principalement par l'épithélium des alvéoles pulmonaires. Les cellules qui composent l'épithélium alvéolaire ont une prolifération lente, alors que dans un épithélium blessé, cette prolifération s'accélère pour permettre le remplacement des cellules blessées (Guillot et al., 2013). Cette situation est alors favorable à la pénétration de *P. aeruginosa* dans la muqueuse.

Dans un contexte infectieux, *P. aeruginosa* se retrouve très rapidement confrontée au système immunitaire. Pour envahir rapidement le tissu et inactiver le système immunitaire, les bactéries doivent donc collaborer. Les facteurs de virulence ne sont donc pas sécrétés aléatoirement mais à un moment précis pour maximiser leur impact sur les cellules. Cette régulation se fait par un système de communication bactérien sophistiqué appelé le QS (*quorum sensing*).

VII. La régulation des facteurs de virulence par le *quorum sensing*

Le QS est un système de communication bactérien basé sur la détection de la densité cellulaire (Smith & Iglewski, 2003). Cette communication permet à l'ensemble de la population bactérienne de répondre en même temps aux changements environnementaux afin de s'adapter continuellement (*sensing*). La communication se fait grâce à la sécrétion de petites molécules signal diffusibles dans le milieu extérieur, appelées des auto-inducteurs (AI). Chacune des bactéries constituant la population sécrète ces AI, leurs concentrations reflètent donc la densité cellulaire bactérienne (Smith & Iglewski, 2003). Lorsque la densité cellulaire atteint un certain seuil, appelé le *quorum*, les AI pénètrent dans le cytoplasme et par des cascades de régulation coordonnent les réponses bactériennes.

Il existe quatre systèmes de QS chez *P. aeruginosa* : Las, Rhl, PQS et IQS (J. Lee & Zhang, 2015; Smith & Iglewski, 2003; Thi et al., 2020; Turkina & Vikström, 2019). Ils régulent

l'expression d'environ 10% du génome de *P. aeruginosa* (Deep et al., 2011). Ces systèmes sont composés de deux protéines : une auto-inducteur synthase qui produit les AI et un régulateur de la transcription.

Les auto-inducteurs synthases LasI, RhlI, PqsABCDH et IQS produisent leur AI respectif : le *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (3-O-C₁₂-HSL), le *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C₄-HSL), le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) et le 2-(2-hydroxyphényl) -thiazole-4-carbaldehyde (IQS).

Ces systèmes sont interconnectés et sont activés en cascade dont, en premier le système Las (**Figure 12**). Les systèmes Las et Rhl sont activés en début de phase exponentielle de croissance alors que le système PQS et IQS sont activés en fin de phase exponentielle de croissance (Y. Choi et al., 2011).

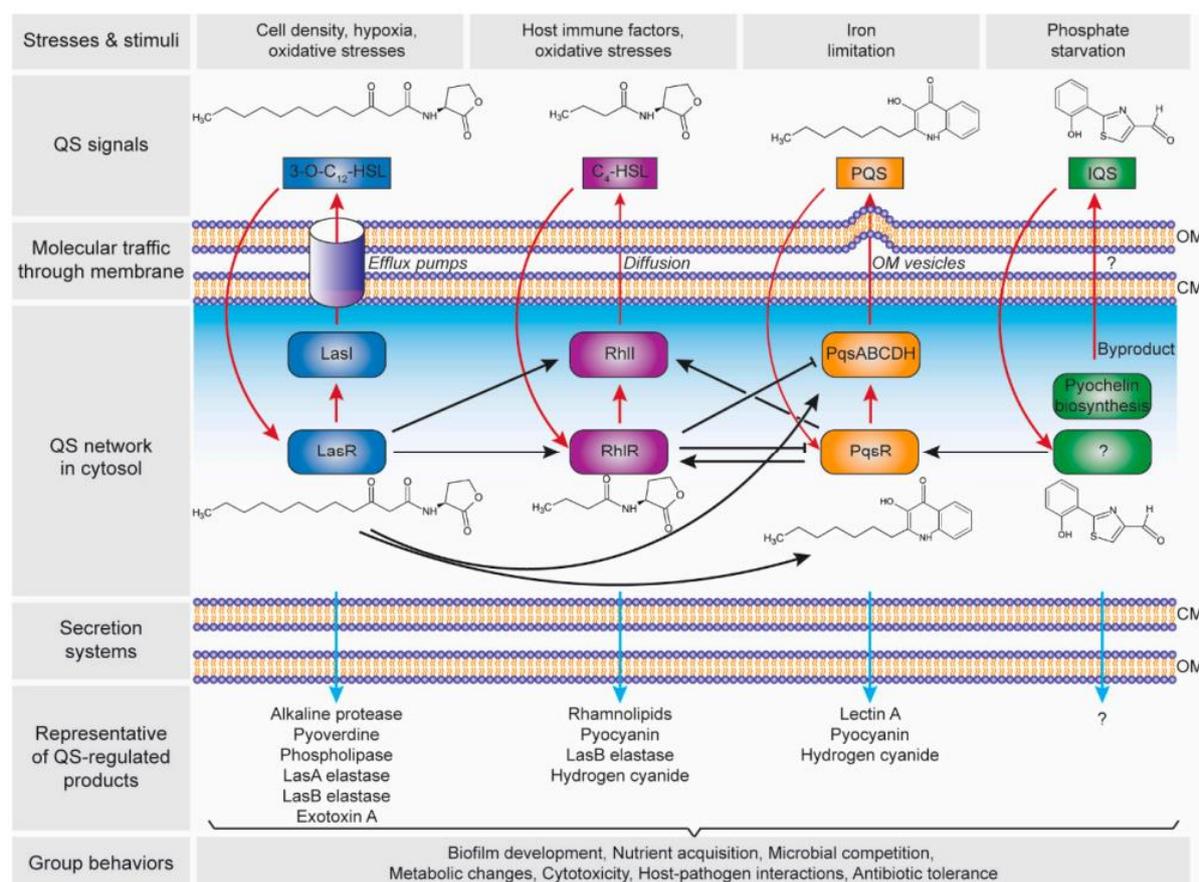


Figure 12 | Hiérarchie des systèmes de QS et régulation des facteurs de virulence associés.

Les quatre systèmes de QS sont activés en réponse à la densité cellulaire et aux stimuli environnementaux, grâce aux quatre AI synthases : LasI, RhlI, PqsABCDH et AmbBCDE. Elles produisent respectivement le 3-O-C₁₂-HSL, le C₄-HSL, le PQS et le IQS. Les boucles d'auto-induction sont représentées par des flèches rouges. Les produits régulés par ces systèmes et plus largement les processus cellulaires sont aussi indiqués. CM : membrane cytoplasmique (interne) ; OM : membrane externe (Thi et al., 2020).

Une fois le *quorum* atteint, l'AI 3-O-C₁₂-HSL produit par LasI forme un complexe avec le régulateur transcriptionnel LasR. Ce complexe régule positivement la transcription de *lasI*,

créant ainsi une boucle d'auto-induction (Seed et al., 1995). Ce complexe, 3-O-C₁₂-HSL/LasR, active aussi la transcription de *rhIR/rhII* et de *pqsR/pqsABCDH*.

De la même façon, l'AI C₄-HSL produit par RhII forme un complexe avec le régulateur transcriptionnel RhIR. Ce complexe régule positivement la transcription de *rhII* créant aussi une boucle d'auto-induction (Winson et al., 1995).

Concernant le système PQS, l'AI PQS produit par PqsABCDH forme un complexe avec le régulateur transcriptionnel PqsR. Ce complexe active la transcription des gènes *pqsABCDH*, *rhII* et *rhIR* (Mcknight et al., 2000). À son tour, RhIR régule négativement *pqsR* et *pqsABCDH*. La découverte du système IQS étant récente, son régulateur transcriptionnel est encore inconnu mais il semble activer la transcription du gène *pqsR* (Meng et al., 2020). De plus, l'AI synthase nommée AmbBCDE semble aussi intervenir dans la voie de biosynthèse de la pyochéline (Trottmann et al., 2019; L. Ye et al., 2014).

Les systèmes de QS régulent de nombreux gènes de virulence comme les élastases LasA et LasB, la pyoverdine et les phospholipases. Le QS est donc impliqué dans de nombreux comportements sociaux importants dans l'évolution d'une infection, comme la capture de nutriments, la cytotoxicité ou encore les interactions hôte-pathogène.

Les systèmes de QS s'avèrent aussi essentiels à la formation de biofilm. En clinique, la formation de biofilm ne correspond plus à une infection aiguë mais à une infection chronique. Il est possible de trouver chez un patient infecté d'abord une infection aiguë qui va se transformer ensuite en une infection chronique et inversement. En revanche, les mécanismes cellulaires mis en jeu lors de ces deux infections sont différents. Pour « jongler » rapidement entre ces deux types d'infections, *P. aeruginosa* possède des réseaux de régulation complexes.

Ces réseaux de régulation et les biofilms de *P. aeruginosa* font l'objet du chapitre 2.

Chapitre 2 : Les biofilms de *P. aeruginosa*

Les premières heures d'hospitalisation d'un patient victime d'une infection aigüe à *P. aeruginosa* sont cruciales. La prise en charge commence généralement par la prescription d'une combinaison d'antibiotiques afin de maximiser les chances d'éradication de la bactérie et éviter ainsi l'apparition d'infections chroniques récalcitrantes.

Les biofilms de *P. aeruginosa* amènent des complications dans environ 90% des infections chroniques liées aux plaies. En 2009, les États-Unis comptaient environ 6,5 millions de patients chroniquement infectés au niveau des plaies, ce qui représentait un coût annuel d'environ 25 milliards de dollars (Sen et al., 2009).

P. aeruginosa est connue pour sa facilité à former des biofilms robustes. C'est d'ailleurs un mode de vie qu'elle adopte prioritairement aussi bien dans l'environnement qu'en cas d'infections (Donlan, 2002). En effet, lorsqu'elles sont isolées, les bactéries, sont plus sensibles aux antibiotiques et sont sujettes à la phagocytose. Le mode de vie biofilm aussi appelé sessile, leur garantit de plus grandes chances de survie face aux environnements hostiles (carences en nutriments ou faible teneur en oxygène), aux traitements antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte. Ainsi, en comparaison avec leurs congénères planctoniques, les bactéries en biofilm sont beaucoup plus résistantes lors d'une exposition aux antibiotiques (Lewis, 2001).

Les biofilms sont décrits comme des agrégats complexes, formés par une ou plusieurs espèces microbiennes (bactéries, levures) attachées sur une surface biotique ou abiotique (Donlan, 2002). Ces microorganismes sont immobilisés dans une matrice extracellulaire sécrétée par ces mêmes micro-organismes. Les biofilms multi-organismes sont prédominants dans l'environnement tandis que les biofilms mono-organismes sont le plus souvent associés aux infections (O'toole et al., 2000)

La transition d'un mode de vie planctonique à un mode de vie biofilm est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs mécanismes de régulation. L'identification des acteurs de ces mécanismes est d'ailleurs une des stratégies pour trouver de nouvelles cibles afin de lutter contre les biofilms. Il faut noter que la transition d'un mode de vie planctonique vers un mode de vie biofilm est réversible à tout moment. Les mécanismes décrits ci-dessous régulent donc à la fois la transition planctonique-biofilm mais aussi la transition biofilm-planctonique.

I. Les réseaux de régulation favorisant la transition de la vie planctonique vers la vie biofilm chez les bactéries

Ces réseaux de régulation s'effectuent à des niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels. Ils activent l'expression des gènes favorisant l'adhésion et la sécrétion de la matrice tandis qu'ils répriment l'expression des gènes impliqués dans la mobilité et la virulence.

Ces réseaux de régulation comprennent notamment le QS, les petits ARNs non codant (ARNnc) et le second messager c-di-GMP (di-guanosine monophosphate cyclique).

I.1 Le quorum sensing

La formation du biofilm requiert une coordination de l'expression génétique de l'ensemble de la population bactérienne à un temps donné. Pour cela, le QS est déterminant car son activation est dépendante de la densité bactérienne.

Les systèmes Las, Rhl et PQS régulent de nombreux gènes impliqués dans la formation de biofilm comme ceux responsables de la production des rhamnolipides (Diggle et al., 2003; Pearson et al., 1997), du Pel (Sakuragi & Kolter, 2007), des lectines (Diggle et al., 2006; Passos da Silva et al., 2019) et de l'ADN extracellulaire (ADNe) (Allesen-Holm et al., 2006). Les rôles de ces composants dans le biofilm seront abordés dans ce chapitre.

I.2 La régulation par les petits ARNs non codants (ARNnc)

Les ARNnc sont largement impliqués dans la réponse à différents stress environnementaux comme la carence en nutriments, l'hypoxie, l'exposition aux antibiotiques ou encore une forte salinité (Hoe et al., 2013; Holmqvist & Wagner, 2017; Svensson & Sharma, 2016), stress connus pour favoriser la formation de biofilm.

Les ARNnc peuvent réguler négativement et positivement la traduction des ARNm (ARN messagers). Pour cela, ils se fixent en amont de l'ARNm, sur une séquence complémentaire appelée « ribosome binding site ». Cette fixation modifie l'accessibilité aux RNAases et au ribosome modifiant ainsi l'expression de l'ARNm cible (Thomason & Storz, 2010; Waters & Storz, 2009). Cette fixation est généralement stabilisée par une protéine chaperonne appelée Hfq (Valentin-Hansen et al., 2004).

Les ARNnc sont aussi capables d'interagir directement avec les protéines cibles altérant leurs fonctions et/ou, leurs conformations et masquant leurs sites de fixation à d'autres acides nucléiques (Tsui et al., 1994). Les ARNnc sont donc capables de « reprogrammer » le métabolisme de la bactérie et de favoriser ou inhiber la formation de biofilm selon les cibles (Chambers & Sauer, 2013; Martínez et al., 2014).

Plusieurs ARNnc ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. La souche PAO1 en possède 573 dont 149 annotés et 117 expérimentalement validés tandis que la souche PA14 en compte 233 dont 136 annotés et 66 expérimentalement validés. Entre les deux souches, 126 sont en commun bien que des études *in silico* supposent que ce nombre serait en réalité bien plus élevé (Gómez-Lozano et al., 2015; Mikkelsen, McMullan, et al., 2011). Ces chiffres proviennent de la base de données BSRD (L. Li et al., 2013).

Les ARNnc *SrbA* et *RgsA* sont respectivement surexprimés dans les biofilms de PA14 et de PAO1. Bien que leur mécanisme d'action reste encore à préciser, ils jouent un rôle dans la régulation de la mobilité de type swarming, dans la synthèse de pyocyanine et dans la formation de biofilm (Lu et al., 2016; Taylor et al., 2017).

L'ARNnc *ErsA*, impliqué dans la réponse aux stress d'enveloppe, réprime l'expression du gène *algC* qui code l'enzyme AlgC impliquée dans la biosynthèse d'alginate, de Pel, de Psl, du LPS et des rhamnolipides, tous essentiels dans la formation de biofilm (Ferrara et al., 2020; Sohlenkamp et al., 2018).

D'autres ARNnc nommés *RsmY* et *RsmZ* sont très largement impliqués dans la régulation du mode de vie de *P. aeruginosa*. Leur fonctionnement est abordé dans la Revue bibliographique – Chapitre 2 – Section I.4.

I.3 Le second messager c-di-GMP

La molécule c-di-GMP est une molécule ubiquitaire retrouvée dans de nombreuses espèces bactériennes. Elle s'est révélée être un acteur central dans de nombreux comportements bactériens comme l'invasion cellulaire ou l'échappement au système immunitaire de l'hôte. Un très grand nombre d'études ont permis de décortiquer les voies de signalisations et les acteurs mis en jeu (**Figure 13**), permettant d'établir clairement le lien entre le c-di-GMP et la formation de biofilm. Les cibles du c-di-GMP sont régulées positivement ou négativement à des niveaux post-transcriptionnels.

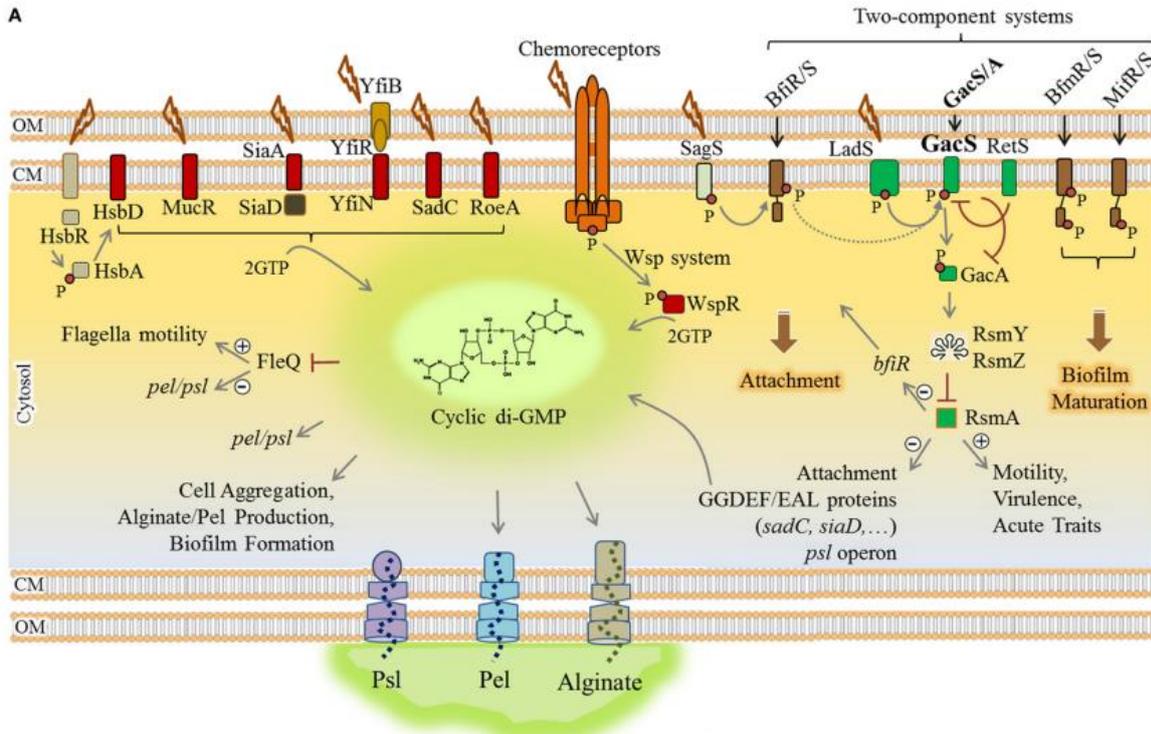


Figure 13 | Réseaux des voies de régulation par le c-di-GMP impliquées dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*.

L'élévation de la quantité de c-di-GMP est le déterminant clé dans la transition planctonique-biofilm. Les changements environnementaux sont perçus par différents réseaux protéiques membranaires : les systèmes à deux-composants (rectangles marrons/verts), le système chémorécepteur (orange) et d'autres récepteurs (situés à gauche). Le signal est transmis par des cascades de phosphorylations (petits cercles rouges) ou par des interactions protéine-protéine. Ce signal active les diguanylates cyclases (avec des motifs GGDEF) (rectangles rouges qui métabolise le c-di-GMP à partir de 2 molécules de GTP (guanosine-5' -triphosphate). Les protéines senseur de c-di-GMP agissent comme récepteurs et effecteurs pour répondre spécifiquement au signal perçu. Le réseau de régulation LadS/RetS/GacS/GacA/RsmA joue un rôle clé dans la transition planctonique-biofilm (Matar et al., 2017).

Le déterminant majeur est la quantité de c-di-GMP présent dans la cellule. En effet, lorsqu'il est présent en grande quantité c'est la formation de biofilm qui est privilégiée, tandis que la mobilité est réprimée. Le niveau de c-di-GMP est régulé par deux groupes de protéines. Le premier groupe contient les DGC (diguanylates cyclases) qui contiennent un motif GGDEF et les phosphodiesterases qui contiennent un motif EAL ou HD-GYP. Les DGC et les phosphodiesterases à motif EAL métabolisent le c-di-GMP tandis que les phosphodiesterases à motif HD-GYP le dégradent (Römling et al., 2013; Valentini & Filloux, 2016). Les DGC et les phosphodiesterases contrôlent le niveau de c-di-GMP en fonction des stimuli environnementaux (Ryan et al., 2006). Le second groupe est composé de protéines senseur de c-di-GMP qui agissent directement sur la transcription des gènes en tant qu'effecteur ou par interaction protéique pour répondre au stimulus perçu précédemment (Römling et al., 2013).

Le c-di-GMP est essentiel à la polymérisation de l'alginate (Remminghorst & Rehm, 2006) qui est le polysaccharide majoritaire de la matrice des biofilms formés par les souches mucoïdes de *P. aeruginosa*. Pour garantir cette polymérisation, c'est la protéine membranaire MucR, en réponse au nitrate perçu, qui synthétise le c-di-GMP (I. D. Hay et al., 2009; Wang et al., 2015).

Le c-di-GMP est aussi essentiel à la synthèse du Psl et du Pel qui sont aussi des polysaccharides de la matrice du biofilm. Dans ce cas, ce sont les DGC SadC et RoeA qui métabolisent le c-di-GMP. Ce c-di-GMP a deux modes d'action. Il peut former un complexe avec PelD, située dans la membrane interne, permettant la sécrétion de Pel, ou il peut aussi former un complexe avec FleQ. FleQ en tant que régulateur transcriptionnel active la biosynthèse du flagelle et réprime l'expression des gènes *pel* et *psl*. Le c-di-GMP en formant un complexe avec FleQ, bloque son activité. En conséquence la biosynthèse du flagelle n'est plus activée et la répression des gènes *psl* et *pel* est levée (Baraquet et al., 2012; V. T. Lee et al., 2007a).

Le système chémosenseur Wsp de *P. aeruginosa* permet de sentir les stress mécaniques membranaires notamment lors de l'attachement sur une surface. Le stimulus perçu engendre une cascade de phosphorylations qui active la DGC WspR (Güvener & Harwood, 2007; Hickman et al., 2005; Huangyutham et al., 2013).

I.4 Le réseau Gac/Rsm

Chez *P. aeruginosa*, la cascade de signalisation majoritaire régulant le mode de vie adoptée par la bactérie est le réseau Gac/Rsm. Cette cascade regroupe plusieurs acteurs moléculaires dont les ARNnc RsmY/RsmZ, la protéine RsmA et le système à deux composants GacA/GacS (Mikkelsen, Sivaneson, et al., 2011; Mulcahy, O'callaghan, et al., 2008; Pita et al., 2018) (**Figure 14**).

La protéine RsmA est le régulateur traductionnel central de ce système. Pour réprimer la traduction, elle entre en compétition avec le ribosome en l'empêchant de se fixer sur le site de fixation au ribosome. Il a aussi été montré que RsmA utilisait ce même mécanisme pour activer l'expression des gènes.

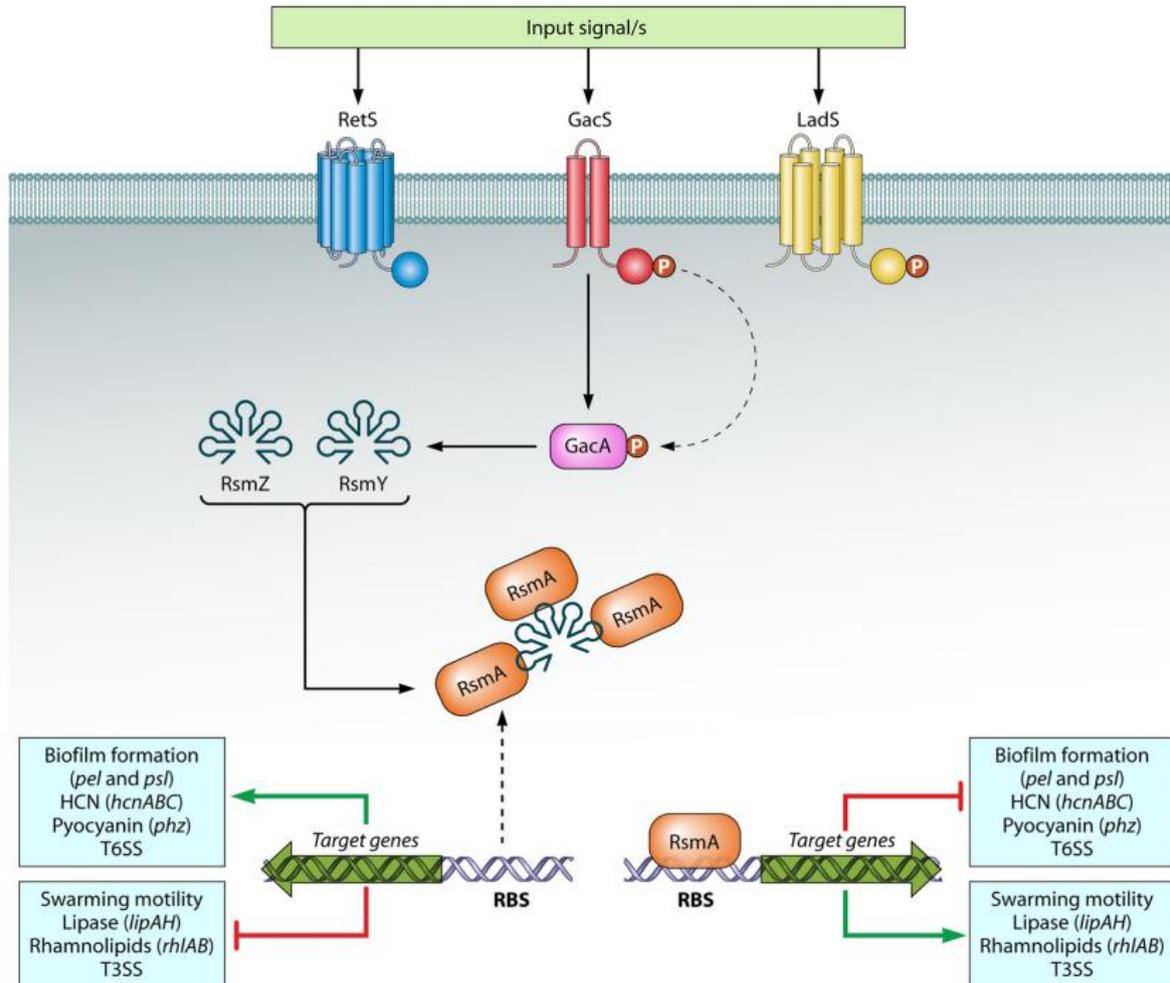


Figure 14 | Le réseaux Gac/Rsm impliqué dans la transition réversible planctonique-biofilm chez *P. aeruginosa*.

RsmA se fixe sur les promoteurs de plusieurs gènes, favorisant la mobilité et la virulence et réprimant la formation de biofilm. La phosphorylation de GacA par GacS active la production des petits ARNnc RsmZ et RsmY. Ils se fixent sur RsmA, libérant le promoteur des gènes associés à la formation de biofilm et réprimant les gènes associés à la virulence et à la mobilité. LadS active la production de RsmZ et RsmY, tandis que RetS forme un complexe avec GacS ce qui inhibe la production de RsmZ et RsmY (Nadal Jimenez et al., 2012).

En conditions non inductrices c'est-à-dire sans stimulus extérieur, RsmA active la traduction des ARNm des gènes du SST3 et de la mobilité tandis qu'elle réprime la traduction des ARNm des gènes associés à la formation de biofilm comme *pel* et *psf* (Brencic & Lory, 2009; Irie et al., 2012). En conditions inductrices, après réception d'un signal environnemental, l'histidine kinase GacS s'autophosphoryle et phosphoryle à son tour le régulateur de réponse GacA. GacA phosphorylée active la transcription des gènes codant les ARNnc RsmY/RsmZ (Valentini & Filloux, 2016).

Ces derniers, fortement affins avec RsmA, la séquestrent. La séquestration de RsmA permet la traduction des ARNm de Pel et Psl car le site de fixation du ribosome est libéré.

Parallèlement, RsmA étant séquestrée, la traduction des ARNm des gènes du SST3 et de la mobilité n'est plus activée (Janssen et al., 2018; Kay et al., 2006; O'Callaghan et al., 2011).

Ce système est finement contrôlé par deux protéines : LadS (lost adherence sensor) et RetS (regulator of exopolysaccharide and type III secretion). LadS agit en parallèle de GacS et contrôle positivement l'expression du Pel et négativement l'expression du SST3 (Ventre et al., 2006). RetS inhibe l'autophosphorylation de GacS par interaction directe, favorisant la vie planctonique (Goodman et al., 2009).

L'ensemble de ces systèmes sont interconnectés et sont en synergie pour moduler le mode de vie de *P. aeruginosa*. C'est le cas par exemple du réseaux Gac/Rsm qui régule aussi la concentration de c-di-GMP. En effet, en conditions non inductrices, RsmA est libre et inactive les DGC nommées SadC et SiaD. Comme les DGC sont bloquées, la concentration en c-di-GMP reste basse, favorisant un mode de vie planctonique. En réponse à un stimulus, RsmA est séquestrée, libérant SadC et SiaD qui peuvent métaboliser le c-di-GMP et favoriser le mode de vie biofilm.

Le cas de l'ARNnc PhrS et du système de QS est un autre exemple d'interconnexion. En effet, PhrS interagit avec le site de fixation du ribosome de l'ARNm de la protéine PqsR du système de QS PQS, augmentant ainsi la quantité d'AI (Sonnleitner et al., 2011).

Ces réseaux de régulation sont non seulement impliqués dans la transition planctonique-biofilm et inversement mais sont aussi exprimés à des niveaux différents tout au long du cycle de développement du biofilm.

Le développement du biofilm est un processus en plusieurs étapes allant de l'attachement de cellules isolées sur une surface jusqu'à la dispersion d'agrégats bactériens dans l'environnement. Les cellules utilisent le c-di-GMP comme point de passage pour franchir toutes les étapes de ce processus. Le c-di-GMP leur permet aussi de revenir à un état planctonique à tout moment si nécessaire (Römling et al., 2013).

II. L'infection chronique liée au cycle de vie du biofilm

Les biofilms de *P. aeruginosa* sont retrouvés dans des niches écologiques variées. Ils peuvent se former sur des surfaces abiotiques comme la surface d'un matériel médical implantable ou intubable, d'un réseau de canalisations et sur des surfaces biotiques comme les organes, les tissus, les cellules, les feuilles, le système racinaire (etc.). Ainsi toute surface colonisée par *P. aeruginosa* est susceptible d'être une source de contamination du milieu environnant.

Le cycle de vie du biofilm de *P. aeruginosa* est décrit en 5 étapes : 1) l'adhésion réversible, 2) l'adhésion irréversible, 3) la formation de microcolonies, 4) la maturation et 5) la dispersion (**Figure 15**).

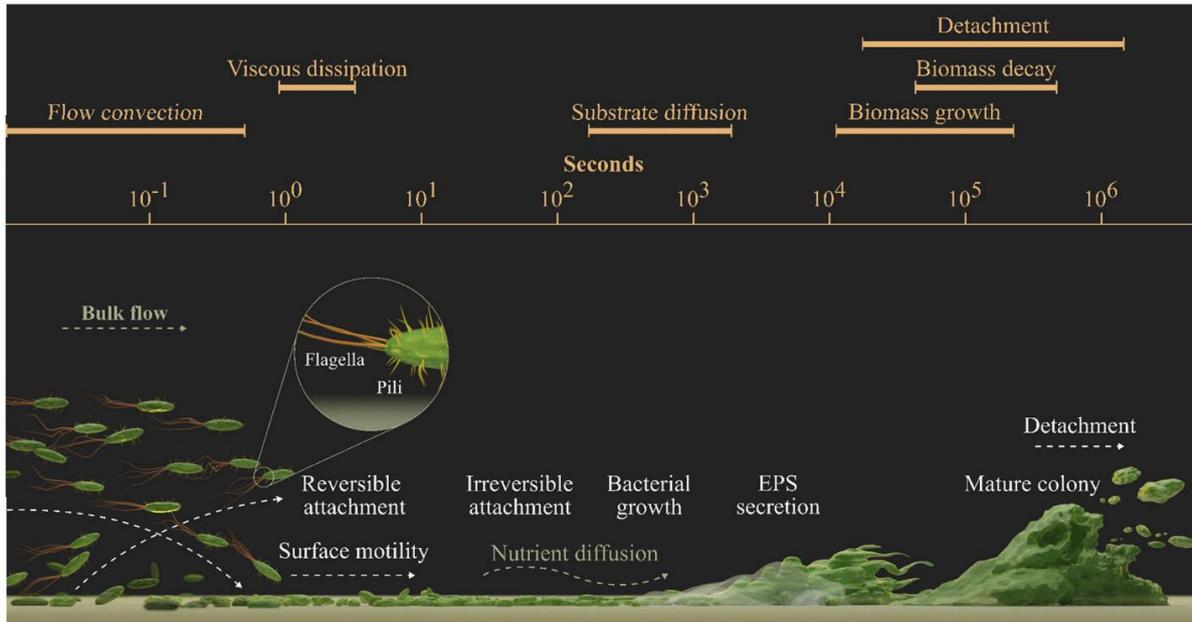


Figure 15 | Les étapes de formation du biofilm.

Ces phénomènes peuvent apparaître en continu ou simultanément avec des repères spatiaux temporels plus ou moins précis (Krsmanovic et al., 2021).

II.1 L'adhésion réversible puis irréversible

Pour que l'adhésion ait lieu, il faut que les bactéries rencontrent dans un premier temps une surface. Les bactéries libres dans leur environnement sont transportées vers cette surface soit de façon passive par sédimentation, par des mouvements brownien (aléatoires et incessants) ou par des forces hydrodynamiques du fluide environnant, soit de façon active par les mouvements propres des bactéries (Katsikogianni et al., 2004).

L'adhésion bactérienne se décompose en deux étapes. La première étape est réversible et fait intervenir des forces physico-chimiques, attractives ou répulsives, entre les bactéries et la surface. Le contact entre les bactéries et la surface est réalisé par des liaisons chimiques faibles et non covalentes de type Van der Waals, de Lewis ou électrostatiques (Renner & Weibel, 2011) (Figure 16 et Figure 17).

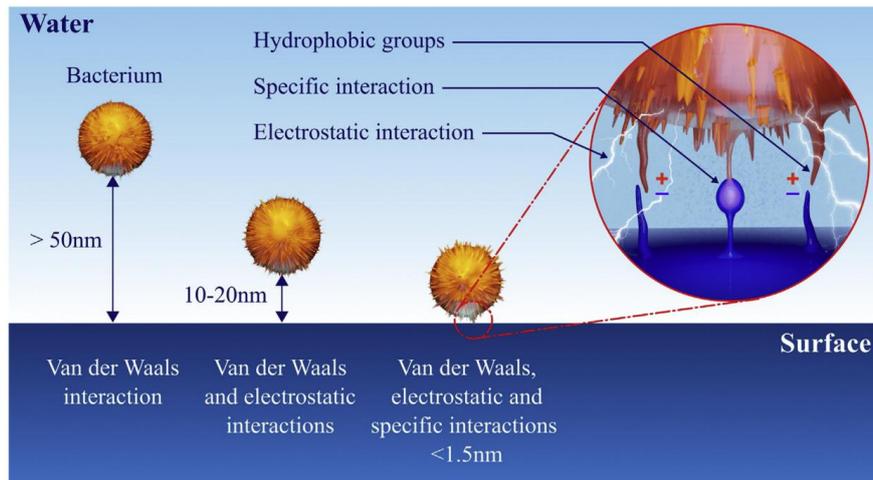


Figure 16 | Les forces mises en jeu lors de l'étape d'adhésion réversible.

À une distance >50nm l'adhésion est influencée par les interactions de Van der Waals. Entre 10 nm et 20 nm, les répulsions électrostatiques peuvent favoriser ou empêcher l'adhésion. À une distance < 1.5 nm l'adhésion cellule-surface est complète grâce aux interactions entre les groupes hydrophobes (Krsmanovic et al., 2021).

Compte-tenu des forces mises en jeu, la nature acido-basique, la présence de charges, l'hydrophobicité et la topologie de la surface influencent le processus d'adhésion. Une surface rugueuse irrégulière avec une forte porosité facilite l'adhésion des bactéries à l'inverse d'une surface lisse qui augmente les forces de cisaillement (Scheuerman et al., 1998).

Lorsque la surface manque de propriétés adhésives, les bactéries sécrètent des molécules qui vont conditionner la surface. Ces molécules sont appelées des biosurfactants. Chez *P. aeruginosa*, les biosurfactants majoritaires sont les rhamnolipides (H.-C. Flemming & Wingender, 2010; Ron & Rosenberg, 2001; Y. D. N. Tremblay et al., 2014).

L'environnement dans lequel se trouve les bactéries a aussi une influence sur l'adhésion. La température, le pH, la force ionique, le flux, le temps d'exposition, la présence d'antibiotique et la concentration bactérienne sont autant de facteurs qui impactent les propriétés de surface et/ou l'expression des structures membranaires utiles à la bactérie pour adhérer (Bunt et al., 1993).

Si les conditions sont favorables au développement du biofilm, l'adhésion devient alors irréversible car les liaisons précédemment formées sont consolidées par les appendices des bactéries (**Figure 17**). Sinon, les bactéries peuvent quitter la surface pour retourner à l'état planctonique.

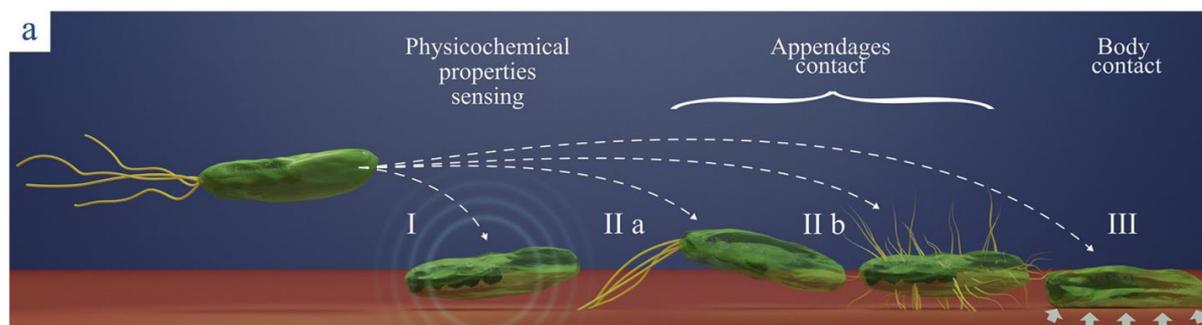


Figure 17 | L'adhésion réversible et irréversible et les acteurs mis en jeu.

(I) Le flagelle permet à la bactérie d'accéder à la surface. (I) Adhésion réversible médiée par les propriétés physico-chimiques. (IIa) Adhésion irréversible médiée par les appendices de la bactérie. (IIb) Contact physique entre la membrane bactérienne et la surface (Krsmanovic et al., 2021).

Le flagelle permet à la bactérie de se rapprocher de la surface par un déplacement de type swimming dans un l'environnement liquide ou de type swarming dans un environnement semi-solide. Le flagelle participe aussi à l'adhésion sur les cellules épithéliales. Chez la souche PAO1, la protéine FliD, qui compose la coiffe du flagelle, reconnaît le récepteur MUC1 des protéines du mucus pulmonaire appelées mucines (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013).

Il a aussi été montré que les *pili* de type IV participent à l'adhésion avec deux formes modifiées du LPS. Ces modifications touchent particulièrement la chaîne polysaccharidique-O et se font sous l'influence des conditions environnementales, afin, pour la bactérie, de s'adapter à tous types de surface. La première forme modifiée de LPS induit une augmentation de l'hydrophobicité de la membrane, facilitant l'adhésion sur des surfaces hydrophobes. La seconde modification diminue cette hydrophobicité pour faciliter l'adhésion sur des surfaces hydrophiles (Makin & Beveridge, 1996).

Durant l'adhésion, une fine régulation de la mobilité est effectuée. En effet le flagelle permet une mobilité en milieu liquide, adaptée au mode de vie planctonique. Suite à l'adhésion, ce sont les *pili* de type IV qui prennent le relais pour une mobilité de type twitching, qui convient mieux à l'exploration d'une surface solide (Klausen, Heydorn, et al., 2003; O'Toole & Kolter, 1998). La mobilité de type twitching est 100 fois moins rapide que la mobilité de type swimming, et impose que les cellules soient en contact les unes avec les autres (Semmler et al., 1999).

Lors d'une infection, les forces exercées sur le biofilm, peuvent le décrocher de son support. Ainsi, chez les patients atteints de mucoviscidose sous thérapie par inhalation, les lectines LecA et LecB renforceraient l'adhésion des bactéries sur l'épithélium respiratoire (Mewe et al., 2005). Il est tout de même important de nuancer cette hypothèse. En effet, une autre étude a montré que 95% des bactéries ne sont pas adhérentes à la surface épithéliale mais forment des

agrégats en suspension dans le mucus (McCarthy et al., 2014). Ces agrégats sont appelés des « microcolonies flottantes ».

II.2 La formation de microcolonies et la maturation

Lorsque la monocouche de bactéries est correctement établie sur la surface, celles-ci commencent à former des structures appelées microcolonies et s'entourent progressivement d'une matrice extracellulaire. Les microcolonies continuent de croître jusqu'à former de larges agrégats, appelés macrocolonies. Tout au long de cette phase de maturation, des changements physiologiques surviennent chez les bactéries comme la résistance aux stress et aux antibiotiques.

Ces différentes étapes sont contrôlées par le QS. Ainsi, des mutants privés des systèmes de QS Las et Rhl, forment des biofilms fins, moins structurés et plus sensibles aux antibiotiques (Nelson et al., 2009).

La structure 3D du biofilm mature varie selon les sources de carbone présentes dans l'environnement. En présence de glucose, les biofilms de la souche PAO1 présentent des structures très hétérogènes en forme de champignons. En présence de citrate, les biofilms sont homogènes et plats (Klausen, Heydorn, et al., 2003) (**Figure 18**).

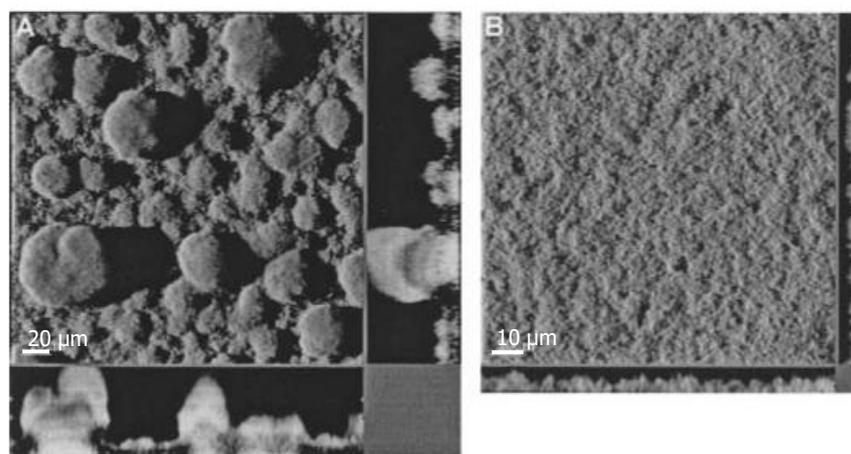


Figure 18 | Structure des biofilms de *P. aeruginosa* selon les sources de carbone.

Observation en microscopie confocale des biofilms de 5 jours formés par la souche PAO1 en milieu glucosé (**A**) ou en présence de citrate (**B**) (Klausen, Heydorn, et al., 2003).

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de l'accessibilité aux nutriments, de la synthèse et de la sécrétion de matériel extracellulaire, et également du stress environnemental. Bien que, la production de cette matrice ait un coût énergétique conséquent pour les bactéries, sa présence est vitale d'un point de vue structurel et physicochimique. En effet, outre son rôle protecteur, la matrice sert « d'échafaudage » pour supporter les structures

3D du biofilm. Elle facilite aussi la communication entre les cellules et régule l'accessibilité aux nutriments (Liao et al., 2013).

La matrice, composée à plus de 97% d'eau, contient des composés solubles comme les polysaccharides gélifiés ou EPS, des rhamnolipides, des protéines et de l'ADN extracellulaire (ADNe) (H.-C. Flemming & Wingender, 2010) et des composés insolubles comme la cellulose (Serra et al., 2013) et les appendices bactériens (Hobley et al., 2015). Les rôles majeurs de ces composants sont de soutenir et d'apporter de la rigidité à la structure du biofilm et de faciliter les interactions et la communication entre les bactéries.

Au sein de cette matrice se trouve aussi des nombreux pores et canaux entre les macrocolonies (Karimi et al., 2015) . Ce « réseau d'irrigation » permet aux liquides et nutriments de circuler dans le biofilm (Wilking et al., 2013).

II.2.1 Les exopolysaccharides

Les EPS déterminent l'architecture du biofilm. Ils organisent spatialement les microcolonies au sein de la matrice (Neu & Lawrence, 2015) et sont aussi impliqués dans la stabilité du biofilm (Persat et al., 2015).

Le Pel, le Psl et l'alginate sont les trois EPS sécrétés par *P. aeruginosa*.

II.2.1.1 L'alginate

L'alginate est responsable de l'apparition du phénotype mucoïde chez certains isolats cliniques. Ces souches mucoïdes, particulièrement pathogènes, présentent une surproduction d'alginate et sont retrouvées en abondance chez les patients atteints de mucoviscidose (Pulcrano et al., 2012). L'alginate est un copolymère, chargé négativement, d'acide-D-mannuronique et d'acide-L-guluronique, reliés par des ponts β -1,4 (Mann & Wozniak, 2012). Généralement, la production d'alginate intervient en réponse à un stress d'enveloppe, comme l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane ou la désorganisation des protéines de la membrane externe (L. F. Wood & Ohman, 2014).

La synthèse de l'alginate se fait grâce à l'opéron *algA-AlgD* (**Figure 19**). La transcription de cet opéron est sous la dépendance d'un facteur sigma appelé AlgU. En condition non inductrice, c'est-à-dire sans stress, AlgU est séquestré par MucA, un facteur anti-sigma localisé dans la membrane. Le complexe AlgU-MucA est stabilisé par MucB. En condition stressante, le stimulus est détecté par la protéine senseur MucE qui va activer la protéase AlgW. Cette dernière, avec l'aide de la protéase MucP clive la liaison AlgU-MucA. AlgU ainsi libérée active la transcription de l'opéron *algA-AlgD* (Damron & Yu, 2011). Certains isolats possèdent une mutation sur *mucA*, ce qui inhibe son activité anti-sigma. En conséquence, AlgU n'est plus séquestrée et l'opéron *algA-AlgD* est constamment activé (D. Qiu et al., 2007). Les souches

mucoïdes sont plus résistantes au système immunitaire car l'alginate piège les ROS produits durant la réaction inflammatoire par les macrophages et les neutrophiles (Ramsey & Wozniak, 2005).

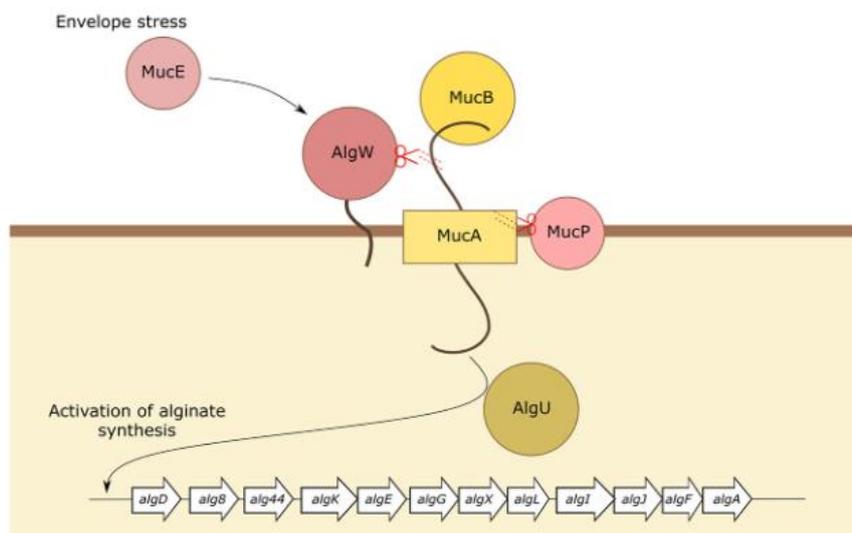


Figure 19 | Régulation de la biosynthèse d'alginate par le facteur sigma AlgU.
(Mauders & Welch, 2017)

À cause de la forte prévalence des biofilms de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, il a longtemps été admis que l'EPS majoritaire de la matrice était l'alginate et ce quelle que soit la mucoïdie de la souche. En 2003, l'équipe de Persek a été la première à montrer que chez les souches non mucoïdes de PA14 et PAO1, l'alginate n'était pas l'EPS le plus abondant et parfois n'était pas produit durant la formation de biofilm (Wozniak et al., 2003).

II.2.1.2 Le Pel et le Psl

L'EPS Pel a été ainsi nommé car il est fortement impliqué dans la formation de pellicules. Ces biofilms ne sont pas accrochés sur une surface mais sont situés à l'interface liquide-air. Ces biofilms « flottants » permettent aux bactéries d'accéder à de fortes concentrations en oxygène et en nutriments.

Les gènes impliqués dans la formation de cette pellicule ont été découverts pour la première fois chez la souche PA14 : l'opéron *pel* est composé de 7 gènes allant de *pelA* à *pelG*. L'expression de cet opéron est contrôlée par le QS et le c-di-GMP via PelD et FleQ (Baraquet et al., 2012; V. T. Lee et al., 2007b). Il code à la fois l'EPS Pel et son système de transport. L'EPS Pel est responsable d'une matrice riche en glucose car il est constitué d'acétylgalactosamine et de N-acétylglucosamine (Friedman & Kolter, 2004a).

Contrairement à la souche PAO1 qui produit le Pel et le Psl, la souche PA14, produit uniquement le Pel. Une étude a montré que pour compenser le manque du Psl, Pel, grâce à

sa charge positive, est capable de se lier à l'ADNe (ADN extracellulaire), pour maintenir les interactions cellule-cellule (Jennings et al., 2015).

Une étude a montré que la sécrétion de Pel et la mobilité de type twitching sont étroitement liées. En effet la « trainée » de Pel laissée lors du déplacement des bactéries sur la surface sert de guide pour les prochaines bactéries, facilitant l'exploration de la surface et la formation de microcolonies (Wang et al., 2013).

L'EPS Psl est codé par l'opéron *psl* constitué de 15 gènes allant de *pslA* à *pslO* (Jackson et al., 2004). Sa transcription est régulée positivement par les deux facteurs sigma RpoS et AlgU tandis que sa traduction est régulée négativement par RsmA (Irie et al., 2010). Le *Pel* est constitué de D-mannose, de D-glucose et de L-rhamnose (Friedman & Kolter, 2004b). Il s'est révélé être important dans l'adhésion sur les surfaces biotiques ou abiotiques, dans le maintien de la structure du biofilm et dans sa maturation. Cet EPS est important lors de l'adhésion en particulier dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose *via* la reconnaissance de la mucine respiratoire abondante chez ces patients (L. Ma et al., 2006). En outre, le Psl, grâce à sa structure hélicoïdale, forme de longues structures fibreuses qui servent de support pour les bactéries situées à proximité renforçant ainsi les interactions cellule-cellule.

Psl interagit avec les protéines de la matrice, comme CdrA et LecB. Ces interactions garantissent la rétention des bactéries et du Psl au cœur du biofilm afin de stabiliser et favoriser sa croissance par autoaggrégation cellulaire (Borlee et al., 2010; Passos da Silva et al., 2019).

Enfin, Pel et Psl sont impliquées dans la résistance aux réponses immunitaires et aux traitements antibiotiques (Gellatly & Hancock, 2013; Ryder et al., 2007; Stempel et al., 2013)

II.2.2 L'ADN extracellulaire (ADNe)

Une étude de colocalisation a montré une interaction entre l'ADNe et le Psl. Ce complexe, situé autour des agrégats cellulaires, servirait de squelette pour les futures structures fibreuses formées par Psl (Wang et al., 2015). Ces fibres, constituées d'un mélange d'ADNe et de Psl, sont souvent à proximité de bactéries lysées suggérant un ADNe d'origine bactérienne. Cependant, le Psl est aussi capable d'interagir avec l'ADNe provenant des cellules de l'hôte ou d'autres bactéries. Ces interactions avec d'autres sources d'ADNe augmentent les chances de survie de *P. aeruginosa*, en particulier lors d'une infection. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les biofilms sont essentiellement constitués d'ADNe provenant de la lyse des leucocytes (Khatri et al., 2003). La présence de Psl pourrait aussi protéger les bactéries de la lyse grâce aux propriétés acidifiantes et chélatantes de l'ADNe (Wang et al., 2015; Wilton et al., 2015).

Le système de QS PQS s'avère essentiel à la libération de l'ADNe par autolyse des bactéries. L'équipe d'Argenio a montré qu'une souche de *P. aeruginosa* déficiente en molécule signal PQS ne présente aucune autolyse (D'Argenio et al., 2002). Ces résultats ont été complétés par Yang et collaborateurs, qui ont mis en évidence l'importance de l'autolyse *via* le PQS dans la formation des structures en forme de champignon (L. Yang et al., 2009).

L'ADNe ajuste l'hydrophobicité de la membrane bactérienne, améliorant les interactions avec le tapis bactérien adhérent et avec les bactéries voisines (Wang et al., 2015). Il permet aussi l'expansion des microcolonies, en coordonnant le mouvement cellulaire vers les bords du biofilm *via* le twitching (Wilton et al., 2015). Il participe à la formation des structures en champignon grâce à son interaction avec Pel. En dernier recours, en cas de « famine », il sert aussi de nutriment (Finkel & Kolter, 2001; Mulcahy et al., 2010). Enfin de par sa propriété chélatante, il accroît la résistance aux antimicrobiens (Mulcahy, Charron-Mazenod, et al., 2008).

II.2.3 Les rhamnolipides (RLs)

II.2.3.1 La diversité structurale

Les RLs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils présentent une double affinité par leur structure. La partie hydrophile (ou tête polaire) possède une affinité pour les solvants polaires comme l'eau. La partie hydrophobe ou lipophile (ou queue apolaire) possède une affinité pour les solvants organiques. Les molécules amphiphiles sont donc retrouvées dans une interface où il leur est possible d'orienter leurs parties polaires dans l'eau et leur partie apolaire dans l'air ou l'huile par exemple (Ghosh et al., 2020).

Les surfactants (ou tensioactifs) sont des molécules amphiphiles qui une fois localisées à l'interface vont jouer un rôle dans la tension superficielle. Les biosurfactants sont une sous-classe de tensioactifs produits par les microorganismes (Sarubbo et al., 2022). Les RLs sont considérés comme des biosurfactants et font partie de la catégorie des glycolipides (De Araújo Padilha et al., 2019; J. R. De Sousa et al., 2011; Salazar-Bryam et al., 2021).

La production de RLs par *P. aeruginosa* a été décrite pour la première fois en 1946 (Bergström et al., 1946), et pendant plus de 50 ans *P. aeruginosa* a été considérée comme la seule à en produire. Depuis, d'autres bactéries, productrices de RLs, ont été identifiées comme *P. putida* (Onbasli & Aslim, 2009), *Acinetobacter calcoaceticus* (Rooney et al., 2009) ou *Burkholderia thailandensis* (Dubeau et al., 2009).

Un première structure de RL a été proposée par Jarvis et Johnson (Jarvis & Johnson, 1949). Cette structure correspond à l'un des rhamnolipides majoritaires produits par *P. aeruginosa*. Depuis bien d'autres structures de RLs ont été élucidées, laissant apparaître un squelette

commun entre tous les congénères (Abalos et al., 2001; Déziel et al., 1999, 2000; Edwards & Hayashi, 1965; Guo et al., 2009; Hakko, s. d.; G. Hauser & Karnovsky, 1954; Hirayama & Kato, 1982; Nitschke et al., 2010; Rendell et al., 1990; Shaw, 1970; Sylđatk et al., s. d.; Tiso et al., 2020; S. L. Wagner Fritz, 1987; M. Yamaguchi et al., 1976). La tête hydrophile se compose d'un ou de deux rhamnose(s) et la queue hydrophobe est constituée d'une ou plusieurs chaîne(s) d'acides gras β -hydroxylée(s). Ces deux parties sont reliées par une liaison O-glycosidique. Les différents congénères ont été classés selon leur nombre de rhamnoses et de chaînes d'acide gras. On distingue ainsi 5 familles dont 4 sont représentées sur la **Figure 20** : les mono-rhamno-mono-lipides, les di-rhamno-mono-lipides, les mono-rhamno-di-lipides, les di-rhamno-di-lipides et les di-rhamno-tri-lipides.

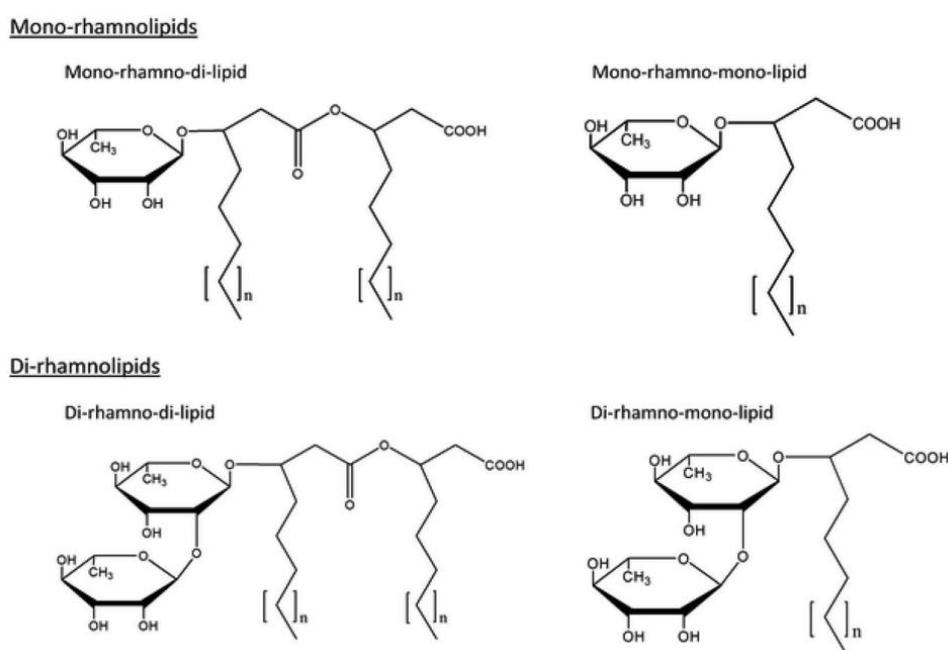


Figure 20 | Les différentes structures des rhamnolipides.

Le n correspond au nombre de carbone ($n = 4, 6$ et 8) (Eslami et al., 2020).

Au total et en comptant les possibles insaturations sur les chaînes d'acides gras, il existe environ une soixantaine de rhamnolipides différents. *P. aeruginosa* produit 28 d'entre eux dont les deux plus abondants sont le rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (R-C10-C10) et le rhamnosyl-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (R-R-C10-C10) (Déziel et al., 1999). *P. aeruginosa* produit donc un mélange de mono-rhamno et de di-rhamno, chacun présentant un nombre, et une longueur de chaîne d'acide gras variable et potentiellement des insaturations. D'autres espèces comme *P. chlororaphis* produisent seulement des mono-rhamnolipides (Gunther et al., 2005).

II.2.3.2 La synthèse des RLs

La biosynthèse des RLs est pour le moment entièrement élucidée uniquement chez *P. aeruginosa* et est présentée Figure 21.

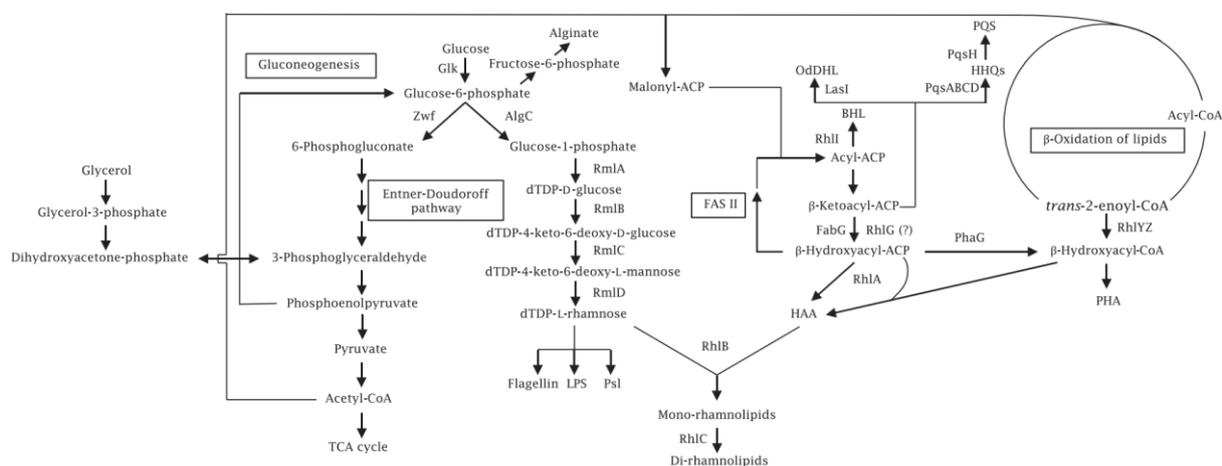


Figure 21 | La biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*.
(Suh et al., 2019)

La synthèse des RLs se fait à partir de deux précurseurs : le dTDP-L-rhamnose (thymidine diphosphate ; qui sera abrégé sous le nom de rhamnose pour la suite) et d'un acide gras β -hydroxy.

Le rhamnose provient de la transformation du glucose par une succession de réactions enzymatiques réalisées par AlgC et RmlABCD. Le glucose peut venir de l'environnement, de la glyconéogenèse ou de la dégradation intracellulaire du glycogène (Olvera et al., 1999). Ce rhamnose est aussi utilisé dans la voie de biosynthèse du LPS (Rahim et al., 2000), du Psl (Byrd et al., 2009) et du flagelle (Lindhout et al., 2009).

L'acide gras, quant à lui, provient de la voie de biosynthèse *de novo* des lipides (FAS II) ou du catabolisme des lipides *via* la voie β -oxydation, sachant que ces deux voies participent équitablement (Abdel-Mawgoud et al., 2010, 2014). La première voie donne à terme un β -hydroxyacyl-ACP tandis que la seconde donne un β -hydroxyacyl-CoA.

C'est ensuite l'activité successive de trois enzymes rhamnosyltransférases qui permet la synthèse des RLs.

En 1994, grâce à la découverte des gènes *rhlA* et *rhlB*, la première rhamnosyltransférase est identifiée et est nommée RhlB (Ochsner et al., 1994). L'activité catalytique de cette enzyme permet de greffer le groupement rhamnose sur un précurseur qui sera appelé HAA (3-(3-hydroxy-alkanoyloxy) -alkanoic acids) afin de former un mono-rhamnolipide. Ces précurseurs HAAs n'ont été identifiés qu'en 2002 (Lépine et al., 2002).

En 2001, la deuxième rhamnosyltransférase nommée RhIC, est identifiée. Elle assure le greffage d'un second groupe rhamnose sur le mono-rhamnolipide précédemment formé, pour constituer le di-rhamnolipide (Rahim et al., 2001a).

Enfin, c'est en 2008, que RhIA est caractérisée en tant qu'enzyme permettant la synthèse des HAAs. Elle catalyse la dimérisation du β -hydroxyacyl-ACP et du β -hydroxyacyl-CoA (Abdel-Mawgoud et al., 2014; K. Zhu & Rock, 2008).

Au terme de cette biosynthèse, le mélange de RLs est destiné à être sécrété dans le milieu extérieur. Le mécanisme et les acteurs impliqués dans cette sécrétion restent inconnus à ce jour. Les gènes codant pour les rhamnosyltransférases RhlABC, sont situés sur deux opérons distincts. Le premier est l'opéron *rhlA-rhlB*. Le second opéron implique *rhlC* et le gène *pa1131*. La protéine codée par ce dernier gène reste, de fonction inconnue. Elle est définie comme un transporteur hypothétique, contenant 11 domaines transmembranaires. L'hypothèse quant à sa participation à la sécrétion des RLs a été émise mais n'a jamais été confirmée expérimentalement (Rahim et al., 2001b).

L'expression de l'opéron *rhlA-rhlB* est augmentée de 100 fois en fin de phase stationnaire de croissance alors que celle de *rhlC* n'augmente que de 7 fois (V. E. Wagner et al., 2003). Cette donnée, et la présence de deux opérons distincts, laissent penser qu'il existe une hiérarchie dans la production des mono- et des di-rhamnolipides. Les mono-rhamnolipides seraient produits en premier, suivi de la conversion d'une fraction d'entre eux en di-rhamnolipides.

La régulation de la biosynthèse des rhamnolipides par le QS explique pourquoi les rhamnolipides sont sécrétés en phase stationnaire (Deziel et al., 1996; Ramana & Karanth, 1989a).

II.2.3.3 La régulation de la synthèse des RLs par le QS et l'environnement

La synthèse des RLs est très finement régulée par le QS et les conditions environnementales. Le système de QS Rhl a été appelé ainsi car sa première cible identifiée était l'opéron *rhlA-rhlB* (Ochsner & Reiser, 1995). Bien que le second opéron formé par *rhlC* soit plus éloigné dans le génome, il semble, lui aussi, sous la régulation de RhlR (Rahim et al., 2001a).

Des études ultérieures ont démontré que l'opéron *rmIBDAC*, codant les enzymes permettant la synthèse du rhamnose était aussi régulé pour le système Rhl (Aguirre-Ramírez et al., 2012). En réalité, en connaissant les interconnexions entre les quatre systèmes de QS, ce n'est pas seulement le système Rhl qui régule la synthèse des RLs, mais bien le QS en entier.

Les opérons *rmIBDAC* et *rhlA-rhlB* sont aussi sous la régulation positive du facteur sigma alternatif RpoS (Aguirre-Ramírez et al., 2012; Medina et al., 2003). Le facteur sigma RpoS est le régulateur de la réponse au stress, comme la carence nutritionnelle (Suh et al., 1999). RpoS

réprime l'expression de *rhII* et par conséquent supprime la production d'AI du système Rhl (Whiteley et al., 2000).

En phase stationnaire de croissance, la quantité abondante de cellules induit la régulation par le QS, mais cause aussi un appauvrissement en nutriments comme le phosphate, le nitrate et le fer (Mulligan et al., 1989; Mulligan & Gibbs, 1989a). Des études de suivies cinétiques ont permis d'évaluer la sécrétion des RLs en fonction de plusieurs conditions de croissance. Une étude de 2017 a montré que *P. aeruginosa* produisait préférentiellement des mono-rhamnolipides en présence d'acide gras à longue chaîne et des di-rhamnolipides en présence de glucose ou de glycérol. Ces résultats suggèrent que la production de mono- et de di-rhamnolipides est basée sur la facilité à synthétiser la moitié acide gras ou la moitié rhamnose (Nicolò et al., 2017).

La sécrétion des RLs varie aussi selon les sources d'azote disponibles. Elle est inhibée en présence de NH_4^+ , de glutamine, d'asparagine et d'arginine mais est augmentée en présence de NO_3^- , de glutamate et d'aspartate (Kohler et al., 2000; Mulligan & Gibbs, 1989b; Ramana & Karanth, 1989b). Enfin, la sécrétion de RLs n'est pas modifiée en absence d'oxygène (Chayabutra et al., 2001).

II.2.3.4 Les rôles des RLs dans la formation de biofilm

Certaines études sont venues préciser le lien entre les RLs et le swarming (Caiazza et al., 2005; J. Tremblay et al., 2007). La mobilité de type swarming se base sur le chimiotactisme, c'est à dire la capacité à « sentir » des gradients de molécules dans l'environnement. Les deux acteurs sont les HAAs et les di-rhamnolipides et ont des actions opposées. Les di-rhamnolipides servent de molécules attractives qui vont attirer les cellules tandis que les HAAs sont répulsifs. Ces deux effets sont responsables de la formation de tendrilles (**Figure 22**). Les mono-rhamnolipides servent comme agent de conditionnement mais n'ont que très peu d'effet sur le swarming. Il faut noter que ce système de chimiotactisme n'a aucun effet sur la mobilité de type swimming confirmant ainsi le rôle exclusif des RLs dans le swarming.

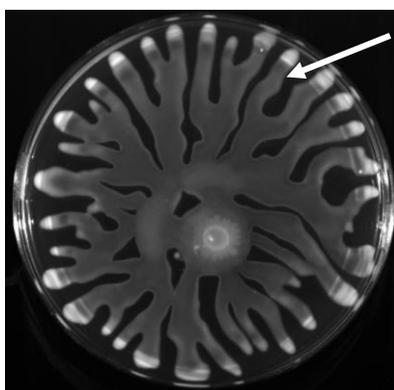


Figure 22 | La mobilité de type swarming chez *P. aeruginosa*.
La flèche blanche indique un tendrille (Lisa Wallart, PBS UMR 6270 CNRS).

Ce chimiotactisme serait notamment utile lorsque le biofilm est confronté à un environnement carencé. En effet, il a été supposé qu'en cas de carences, les RLs permettent de relocaliser la colonie dans des niches plus riches en nitrate, en fer et en phosphate (Glick et al., 2010). En vérité, comme c'est la colonie entière qui doit se déplacer, la mobilité adoptée est plutôt une mobilité communautaire comme le swarming. Le déplacement de type swarming est en fait très complexe et nécessite l'élongation des cellules, la présence d'un nombre suffisant de *pili* et un contact inter-cellulaire (Fraser & Hughes, 1999).

Il est intéressant de noter que l'expression des *pili* de type IV est, comme les RLs, sous l'influence de la disponibilité en nitrate. Lorsque l'environnement est riche en ce composé, l'expression des *pili* est réduite, par conséquent, la mobilité swarming est elle aussi limitée (Goldflam & Rowe, 1983; Ishimoto & Lory, 1989).

Les RLs sont aussi des acteurs importants dans la formation du biofilm. La régulation du biofilm imposée par les RLs dépend de leur localisation dans le biofilm et de leur concentration à un temps donné.

Durant l'adhésion ils peuvent altérer les interactions cellule-cellule et cellule-surface. Une faible concentration en RLs augmente l'hydrophobicité de la surface des cellules par décrochage du LPS. En conséquence, l'affinité des cellules pour la surface est augmentée (Al-Tahhan et al., 2000; Raya et al., s. d.; Y. Zhang & Miller, 1994).

L'augmentation de l'hydrophobicité des cellules semble aussi initier la formation de microcolonies. Les RLs présents en faible concentration permettent l'agrégation des cellules entre elles (Herman et al., 1997; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). En revanche, si le biofilm se trouve confronté à un appauvrissement en nutriment comme le fer, les RLs voient leur production augmentée inhibant ainsi la formation de microcolonies (Patriquin et al., 2008).

Durant la maturation du biofilm, les microcolonies servent de plateforme pour supporter les futures structures 3D en forme de champignon (Klausen, Aaes-Jørgensen, et al., 2003; Klausen, Heydorn, et al., 2003). L'apparition de ces structures signifie que le biofilm a atteint le seuil maximal de maturation. Au sein du biofilm, une sous-population peut redevenir motile pour, au fur et à mesure agrandir ces structures 3D. Les RLs participent activement à la formation, au maintien et à la préservation de ces structures 3D (Davey et al., 2003).

Les bactéries au sein du biofilm mature ont besoin d'eau et de nutriments. Néanmoins, la barrière formée par la matrice limite la diffusion de ces composés. Il existe à l'intérieur du biofilm un réseau de canaux qui permet de maintenir la pression osmotique pour éviter l'effondrement du biofilm, transporter des nutriments et des macromolécules et évacuer les catabolites.

Ces canaux entourent et parfois traversent les clusters bactériens à l'intérieur du biofilm (H.-C. Flemming & Wingender, 2010; Foster & Kolenbrander, 2004). En réalité il existe deux types de transport : l'un par ces canaux, l'autre par les pores (**Figure 23**).

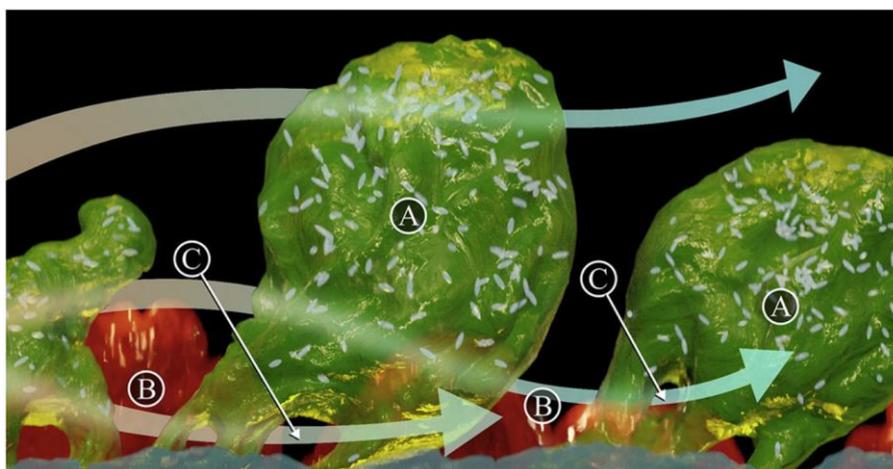


Figure 23 | Les systèmes de circulation au sein des biofilms de *P. aeruginosa*. Les clusters de bactéries forment des microcolonies (A). Les canaux et les pores (B). Les conduits (C). Les flèches indiquent la direction du flux (Krsmanovic et al., 2021).

Les canaux par définition sont longs, vides et droits et permettent de transporter l'eau et les nutriments d'un endroit à un autre. Ce réseau a été nommé « le système de circulation rudimentaire du biofilm ». Les pores quant à eux ne connectent aucunes zones mais sont comparables à des « piscines » qui servent de zone de stockage (H.-C. Flemming & Wingender, 2010). Chez *P. aeruginosa*, ces canaux ont une longueur d'environ 700 nm avec un diamètre variable allant de 1 à 9 nm (Lei et al., 2020; Sandt et al., 2007). Pour garder la circulation active dans ces canaux il est important qu'ils ne soient pas colonisés et restent ouverts. Les RLs, en tant que biosurfactants, peuvent empêcher les interactions cellule-cellule et ainsi évitent l'installation des bactéries dans les canaux (Davey et al., 2003).

II.2.4 Les protéines de la matrice

Les principales protéines qui composent la matrice sont les enzymes et les protéines de structure.

Les enzymes extracellulaires sont impliquées dans la dégradation des biopolymères comme les polysaccharides, les acides nucléiques, les protéines, la cellulose, la chitine et les lipides. Ces différents composés qu'ils soient solubles, insolubles ou emprisonnés dans la matrice servent de source d'énergie pour les bactéries (Costa et al., 2018).

Elles sont aussi capables de dégrader des polymères synthétiques comme le plastifiant téréphtalate (Bahl et al., 2021). Enfin l'activité rédox de certaines enzymes nommées catalases induit la corrosion des surfaces (Busalmen et al., 2002).

Les enzymes extracellulaires sont piégées dans la matrice grâce à leurs interactions avec les EPS (Costa et al., 2018; H. Flemming, 2008), ce qui donne deux avantages. Tout d'abord, les produits de dégradation de ces enzymes se retrouvent à proximité des bactéries et sont donc facilement accessibles. En second lieu, la matrice protège les enzymes de la protéolyse et confère un environnement favorable pour leur activité enzymatique (Skillman et al., 1998).

Les protéines structurelles n'ont, quant à elles, pas d'activité enzymatique mais sont impliquées dans la formation du biofilm et dans la stabilisation de la matrice par pontage des EPS aux bactéries. Ces protéines sont souvent des protéines de liaison aux carbohydrates comme les lectines LecA et LecB (Diggle et al., 2006; Johansson et al., 2008).

Parmi les gènes dont l'expression est modulée par le c-di-GMP, le gène *cdrA* a été le premier identifié. Le gène *cdrA* est en opéron avec *cdrB*. CdrA est la protéine sécrétée et CdrB est son transporteur. Il a été démontré que la protéine CdrA se lie directement à l'EPS Psl dans les biofilms de *P. aeruginosa*. Cette liaison au Psl laisse supposer deux rôles. La protéine CdrA réticule les molécules de Psl et renforce ainsi la matrice, et associée aux cellules, elle permet l'interaction Psl-cellule (Borlee et al., 2010).

II.3 La dispersion du biofilm

Le détachement des cellules du biofilm permet de créer une nouvelle colonie dans une niche écologique plus favorable à son développement. Le détachement des cellules fait suite à la détection de signaux environnementaux ou à l'application de forces mécaniques comme les forces de cisaillement exercées par les fluides.

Deux mécanismes de détachement sont décrits dans la littérature : (I) la dispersion et (II) le détachement d'une partie du biofilm par abrasion, « pâturage », érosion ou « mue » (Harmsen et al., 2010; Kim & Lee, 2016; Petrova & Sauer, 2016) (**Figure 24**). L'abrasion résulte dans la collision avec un grand volume de liquide tandis que le « pâturage » provient de l'activité d'organismes eucaryotes. La « mue » correspond au détachement brutal du biofilm entier ou d'une large portion intacte du biofilm dû aux forces de friction. L'érosion correspond à la libération régulière de bactéries localisées à la surface du biofilm du fait des forces de cisaillement (Kim & Lee, 2016).

À la différence du détachement, la dispersion est un mécanisme actif, c'est-à-dire que les cellules vont volontairement sortir du biofilm à la suite de changements environnementaux laissant une cavité vide (Kim & Lee, 2016).

Seul le phénomène de dispersion sera détaillé dans cette partie.

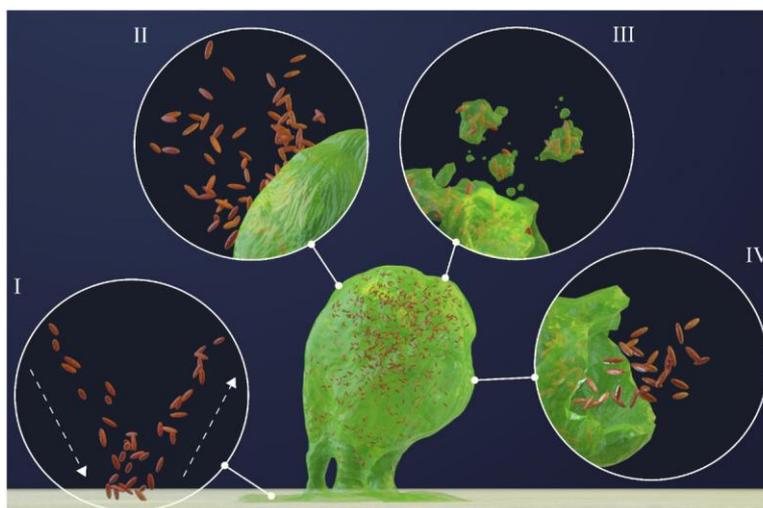


Figure 24 | Les mécanismes de détachement du biofilm.

À l'étape d'adhésion les cellules peuvent quitter la surface par un mécanisme actif comme la désorption **(I)**. Après la maturation du biofilm les cellules peuvent quitter le biofilm par des mécanismes passifs comme l'érosion, l'abrasion, le « pâturage » **(II)** ou la « mue » **(III)**. Suite à la détection de signaux environnementaux les cellules quittent volontairement le biofilm par un mécanisme actif **(IV)** (Krsmanovic et al., 2021).

Ce phénomène de dispersion semble d'abord dépendant de la taille des microcolonies bien que l'âge du biofilm ait aussi son importance. En effet, selon les conditions environnementales, la dispersion du biofilm a lieu environ 3 à 12 jours après l'adhésion initiale, ce qui laisse le temps aux microcolonies de grossir en largeur et en hauteur. La taille des microcolonies est importante car la dispersion nécessite la formation d'une cavité vide à l'intérieur de celles-ci. Ces cavités ne se forment que si les microcolonies ont atteint un diamètre d'environ 80 μm (Harmsen et al., s. d.; Kaplan, 2010; Purevdorj-Gage et al., 2005).

Les nombreuses études menées sur la dispersion ont permis de préciser l'état physiologique des bactéries prêtes à quitter le biofilm. Ces dernières opèrent des changements phénotypiques pour revenir à l'état planctonique (Barraud et al., 2006; Hindré et al., 2008; Petrova & Sauer, 2012; Sauer et al., 2004; Stoodley et al., 2002). Ces changements phénotypiques sont résumés sur la **Figure 25**.

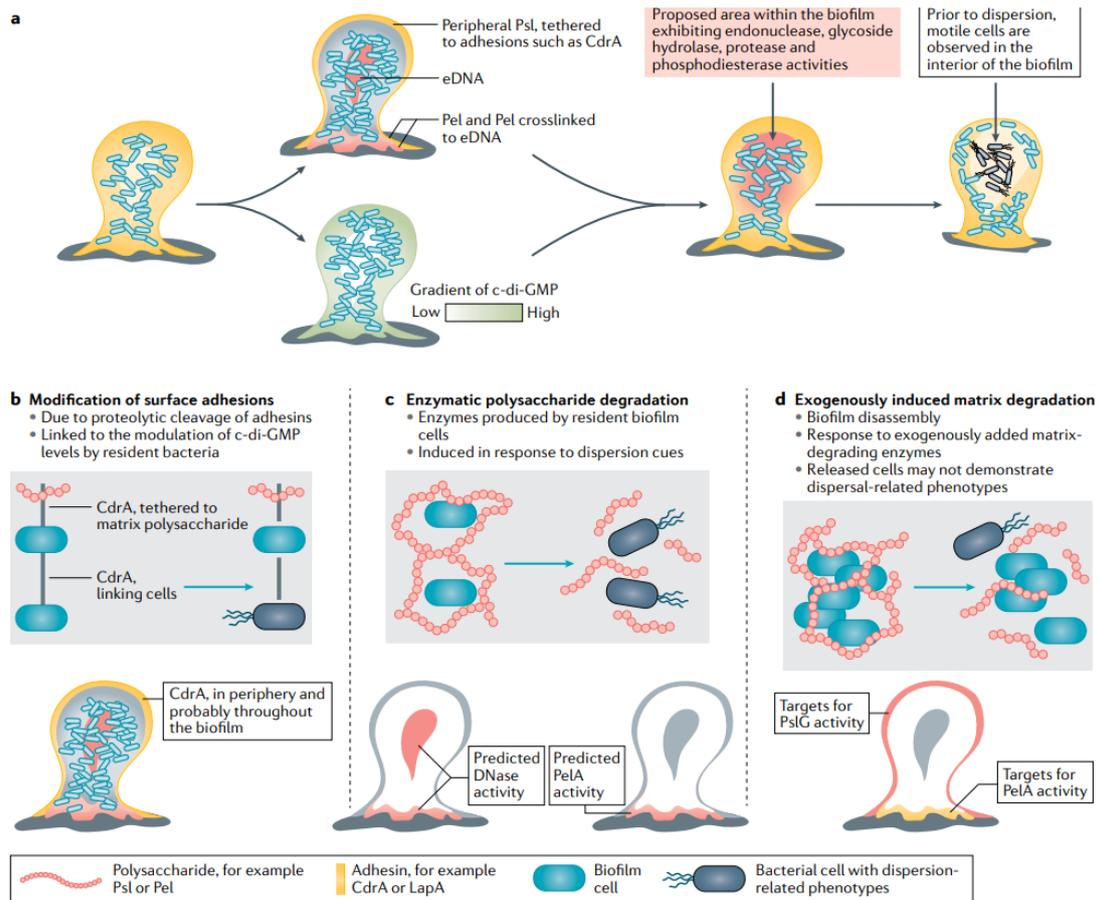


Figure 25 | Mécanismes permettant la dispersion du biofilm.

Localisation spatiale des composants de la matrice et du c-di-GMP à l'intérieur du biofilm mature et zones d'action des enzymes dégradant la matrice **(a)**. L'adhésine de surface CdrA est clivée pour déstructurer la matrice et rompre les interactions cellule-cellule **(b)**. Les composants de la matrice sont dégradés par les enzymes comme les DNases ou PelA **(c)**. Détachement passif d'agrégats suite à l'action d'enzymes exogènes au biofilm **(d)** (Rumbaugh & Sauer, 2020).

Le premier changement phénotypique observé est la récupération d'un phénotype mobile, de type swimming. Ce phénotype a été considéré initialement comme le paramètre le plus important pour la dispersion (Purevdorj-Gage et al., 2005). Depuis, d'autres études sont venues nuancer cet avis. La mobilité serait nécessaire seulement pour la formation de la cavité et l'initiation de la dispersion (Gjermansen et al., 2005; Morgan et al., 2006). Il existerait ainsi une sous-population de cellules mobiles situées en haut ou au milieu du champignon tandis que des cellules non-mobiles seraient situées à la périphérie.

Le second changement phénotypique observé est la sécrétion importante d'enzymes par les bactéries en cours de dispersion. Ces enzymes ont pour rôle la dégradation et la déstructuration de la matrice. La liste de ces enzymes n'est pas exhaustive mais comporte des DNases, des protéases et les enzymes qui dégradent les EPS (Kaplan, 2010; McDougald et al., 2012). Ainsi, l'enzyme AlgL dégrade l'alginate et les glycosyles hydrolases PslG et PelA dégradent respectivement le Psl et le Pel (Boyd & Chakrabarty, 1994; Cherny & Sauer, 2020;

Yu et al., 2015). Les endonucléases EndA, EddA et EddB, quant à elles dégradent l'ADNe (Cherny & Sauer, 2019). Aussi, une étude a montré que l'ajout exogène de DNase induisait une dispersion des biofilms de *P. aeruginosa* (Whitchurch et al., 2002).

Enfin, les rhamnolipides jouent aussi un rôle dans la dispersion. Une première étude a montré que la délétion des gènes *rhIA* et *rhIB* inhibe la formation de la cavité et la dispersion des bactéries tandis que l'ajout exogène de rhamnolipides induit la dispersion des biofilms de *P. aeruginosa* (Boles et al., 2005; Dong et al., 2008). Il est intéressant de noter que les rhamnolipides de *P. aeruginosa* induisent aussi la dispersion des biofilms d'autres espèces bactériennes comme *Bordetella bronchiseptica* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Irie et al., 2005; Mireles et al., 2001), ce qui est non négligeable dans le cadre de la compétition bactérienne pour une niche écologique.

Ces phénotypes sont principalement régulés par le c-di-GMP et le QS en réponse à des signaux environnementaux. Ces signaux sont divers et sont les carences, le stress oxydatif et nitrosant, les facteurs de l'hôte comme les sels biliaires, la disponibilité en oxygène, en fer et en source de carbone (Applegate & Bryers, 1991; Barraud et al., 2009; Basu Roy & Sauer, 2014; Gjermansen et al., 2010; Y. Li et al., 2013; Sauer et al., 2004). Il existe autant de récepteurs que de signaux. Ces récepteurs vont ensuite activer des effecteurs qui vont à leur tour moduler la concentration en c-di-GMP. Ainsi, il a été observé un gradient de concentration en c-di-GMP. Les bactéries en cours de dispersion situées au centre du biofilm présentent une faible concentration de c-di-GMP tandis que celles situées autour présentent une forte concentration de c-di-GMP. Le senseur BdlA affecte négativement la quantité de c-di-GMP suite à la détection d'oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote) (Barraud et al., 2006; Schleheck et al., 2009).

En 2022, un nouveau modèle concernant la formation de biofilm est apparu (Sauer et al., 2022). En effet, entre des biofilms formés *in vitro*, dans l'environnement ou dans un site infectieux, les données récoltées sur l'épaisseur du biofilm et les structures observées varient. En cause, la diversité des microenvironnements au sein du biofilm, l'accès à l'oxygène ou l'exposition à des composés toxiques. L'étude prend aussi en compte la nature de l'environnement (biologique ou non biologique) qui entoure les bactéries et l'exposition du biofilm à un flux (liquide ou air) continu.

Les auteurs gardent la notion d'adhésion des bactéries planctoniques sur la surface, mais proposent deux hypothèses quant à la formation du biofilm : *i*) les bactéries planctoniques formeraient dans un premier temps des agrégats qui ensuite restent libres dans l'environnement ou qui adhèrent à une surface, *ii*) les bactéries et les agrégats situés dans le milieu environnant viendraient s'agréger aux microcolonies déjà formées. Concernant l'étape

de détachement ou de dispersion du biofilm, les auteurs conservent les mécanismes actifs ou passifs décrits ci-dessus.

Au terme du cycle de vie du biofilm et quel que soit le modèle considéré, les bactéries dispersées peuvent de nouveau former un biofilm, soit à proximité du premier biofilm, soit dans une toute nouvelle niche plus éloignée.

En clinique, cela se traduit par une recolonisation constante du tissu (infecté ou sain) et/ou du matériel implanté, désignée sous le terme d'infection chronique. Ce type d'infection présente un taux de mortalité très élevé pour deux raisons. La première est que les bactéries dispersées sont beaucoup plus mobiles, adhérentes et virulentes que leurs congénères planctoniques. Une étude transcriptomique a révélé que les bactéries dispersées exprimaient plus de gènes de virulence et moins de gènes impliqués dans le transport de fer (Chua et al., 2014). L'hypothèse est que ces bactéries, lorsqu'elles quittent l'environnement protecteur du biofilm, adoptent un phénotype hyper-virulent pour se protéger de l'environnement hostile dans lequel elles se retrouvent.

La seconde raison qui explique la forte mortalité associée à ces infections est la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens.

III. La physiologie des biofilms et l'antibiorésistance

Le biofilm présente une tolérance et une résistance remarquable aux agents antibactériens et au système immunitaire. À ce stade, il est important de différencier la tolérance et la résistance, qui sont deux propriétés différentes. La tolérance des bactéries aux antibiotiques est directement liée à l'environnement du biofilm et est perdue lorsque les bactéries se dispersent. La résistance, est, quant à elle intrinsèque aux bactéries et est conservée même lorsqu'elles retournent à l'état planctonique (Brauner et al., 2016; Olsen, 2015). Les mécanismes de résistance seront peu décrits dans ce chapitre car ils ont déjà été abordés dans le chapitre précédent (cf Revue bibliographique - Chapitre 1 – Section VI.).

III.1 Les microenvironnements favorisent la tolérance

L'architecture du biofilm génère des gradients de nutriments, d'oxygène, de pH et de molécules du QS. Les nutriments et l'oxygène sont consommés plus rapidement comparé à leur vitesse de diffusion dans le biofilm. En conséquence, les bactéries localisées tout au long de ces gradients sont dans des états physiologiques différents (**Figure 26**).

Le gradient en oxygène crée un environnement aérobie près de la surface du biofilm, micro aérobie au centre et anaérobie à la base du biofilm. Si l'on considère que le biofilm est mono-espèce et en sachant que *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie, anaérobie-facultative et capable de fermentation, elle peut se développer dans ces trois microenvironnements.

De la même façon, le gradient en nutriments crée deux sous-populations. Une première, dans les couches supérieures du biofilm, a facilement accès aux nutriments. La seconde, à la base du biofilm, se retrouve dans un environnement pauvre voire sans nutriment.

Ces gradients ont un effet direct sur le taux de croissance des bactéries. Celles qui sont dans les couches supérieures du biofilm présentent une croissance rapide et possèdent un métabolisme actif. Celles situées à la base du biofilm se divisent très peu et sont métaboliquement inactives. Elles sont appelées « cellules dormantes » et regroupent les VBNC (viable but nonculturable) et les « persisters » (H.-C. Flemming et al., 2016; Stewart & Franklin, 2008).

Ces microenvironnements créent une forte hétérogénéité de la population sessile. Ainsi durant l'exposition à un antibiotique, les chances de survie de ces différentes sous-populations varient. Les antibiotiques ciblent la synthèse d'ADN, la synthèse des protéines ou la membrane. Ils ont donc une action préférentiellement sur des bactéries métaboliquement actives et en cours de division. Ainsi, les antibiotiques sont inactifs sur des cellules à l'état de dormance. C'est d'ailleurs ces cellules qui contribuent largement à la diminution de la sensibilité des biofilms aux antibiotiques (Stewart, 2002). Elles sont ainsi plus tolérantes à la tobramycine dont la cible est la machinerie ribosomale.

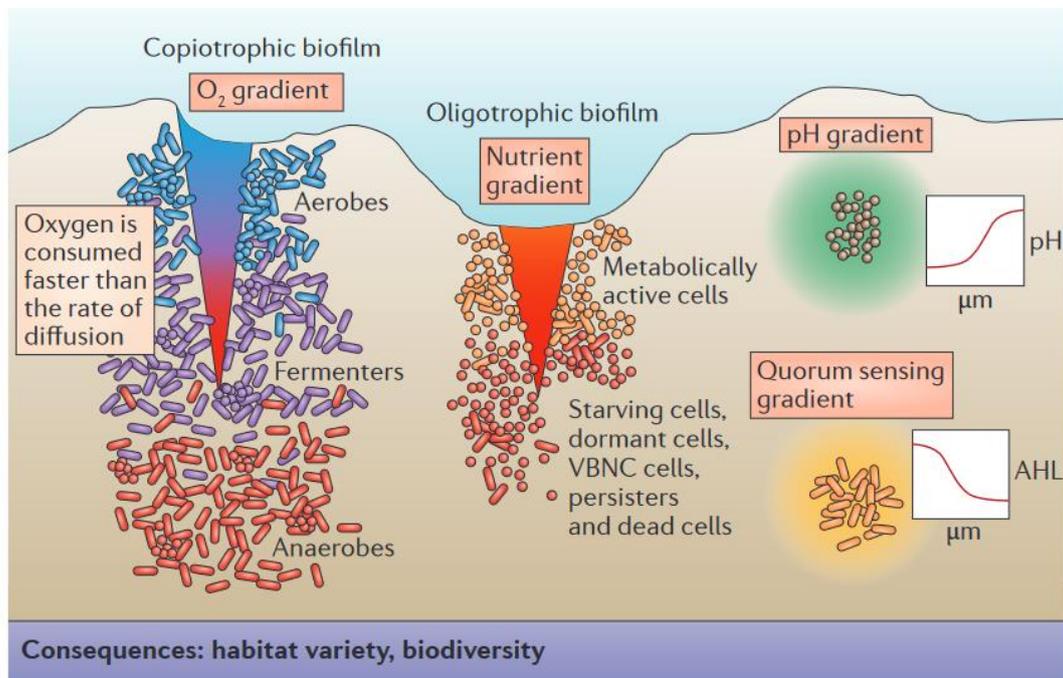


Figure 26 | L'environnement hétérogène des biofilms.

Les différents gradients présents au sein de la matrice créent des microenvironnements. Les microorganismes se positionnent au sein du biofilm selon les disponibilités en oxygène, en sachant que la consommation de ce dernier est plus rapide que sa diffusion. La consommation intensive de nutriment par les organismes aérobies situés sur les couches supérieures du biofilm provoque un appauvrissement des couches inférieures du biofilms. Des gradients de pH et de molécules de QS sont aussi présents au sein du biofilm (H.-C. Flemming et al., 2016).

III.2 Induction de la tolérance par la barrière protectrice de la matrice

Les antibiotiques doivent dans un premier temps traverser la matrice pour accéder aux bactéries. Des premières études ont rapidement suggéré que la matrice ralentissait la diffusion des antibiotiques créant ainsi des gradients de concentration en son sein. Cependant cette affirmation reposait sur des travaux réalisés avec des aminoglycosides et des β -lactamines et n'étaient pas reproductibles (Hoyle et al., 1992; Shigeta et al., 1997; Suci et al., 1994; Vraný et al., 1997; Yasuda et al., 1993).

On s'est rapidement aperçu que les antibiotiques pouvaient passer par les pores et les canaux du biofilm ou pouvaient être stockés dans les piscines (Stewart, 2003).

Il semblerait que ce soit en fait les composants de la matrice qui interagissent avec certains agents antimicrobiens, bloquant ainsi leur diffusion. Précisément, les antibiotiques chargés positivement, comme la tobramycine, sont séquestrés dans les zones périphériques du biofilm, tandis que les antibiotiques non chargés, comme la ciprofloxacine, pénètrent facilement dans au sein du biofilm (Tseng et al., 2013) .

Il est donc possible de distinguer deux groupes de molécules susceptibles d'induire des phénomènes de tolérance/résistance (**Figure 27**).

Les agents antimicrobiens non chargés diffusent de façon homogène dans le biofilm car ils n'interagissent pas avec les EPS. La tolérance face à ces agents est due aux cellules en dormance. En même temps, l'agent antimicrobien favorise l'émergence d'une sous-population bactérienne résistante.

Les agents antimicrobiens et les métaux toxiques chargés voient donc leur diffusion ralentie. Ces agents peuvent interagir avec les EPS, être chélatés ou dégradés par des enzymes de la matrice. L'ADNe peut interagir avec les antibiotiques chargés positivement (Hunt et al., 1995). Ceci confère un avantage à *P. aeruginosa* quand on sait que l'ADNe est abondant lors d'une infection, du fait de la lyse des cellules du système immunitaire.

Chez certaines souches, une surproduction de la matrice confère une plus grande protection face aux agents antimicrobiens. Ainsi, les souches mucoïdes présentent une tolérance plus élevée que leurs congénères non mucoïdes, de même que les souches qui surproduisent les EPS Pel et Psl (Goltermann & Tolker-Nielsen, 2017). Les interactions avec ces EPS induisent un gradient de concentration en antibiotiques. Les bactéries se retrouvent donc face à des concentrations sublétales.

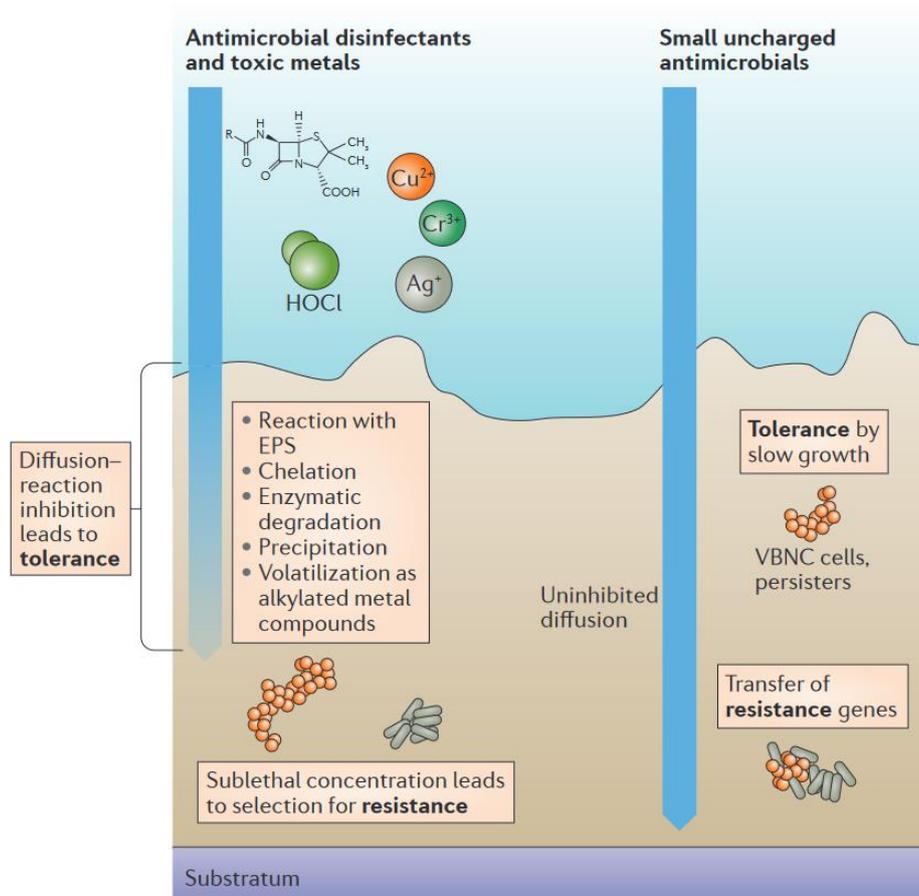


Figure 27 | Les mécanismes de résistance et de tolérance face aux agents antimicrobiens.

Une propriété importante des biofilms concerne l'augmentation des capacités de survie face aux agents antimicrobiens comme les désinfectants, les métaux toxiques et les antibiotiques. La tolérance est induite par un ralentissement de la diffusion de l'agent antimicrobien par les EPS ou par les bactéries métaboliquement non actives. La résistance face à ces agents antimicrobiens survient lorsque les bactéries sont exposées à des concentrations sublétales ou par transferts horizontaux (H.-C. Flemming et al., 2016).

III.3 La tolérance par l'expression génique biofilm-dépendant

L'étude de Pamp et collaborateurs, a révélé l'existence d'une sous-population métaboliquement active tolérante à la colistine (Pamp et al., 2008). À l'inverse, les cellules à l'état de dormance présentaient une sensibilité à cet antibiotique. Les cellules actives avaient acquis cette tolérance, en présence de colistine, grâce à l'expression de l'opéron *pmr*, des gènes *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ* et *muxABC-opmB*. L'opéron *pmr* code un système qui permet l'ajout d'un arabinose aminé sur le LPS, diminuant l'interaction avec la colistine. L'expression de ces gènes étaient spécifiques aux cellules sessiles. En effet, les bactéries planctoniques en phase exponentielle (métaboliquement actives) ou stationnaire (métaboliquement inactives) présentaient une sensibilité à la colistine.

Un autre exemple de gène exprimé seulement à l'état biofilm est le gène *ndvB*, présent chez la souche PA14. Le gène *ndvB* code une enzyme impliquée dans la synthèse des glucanes

retrouvés dans l'espace périplasmique. Ces glucanes séquestrent la tobramycine avant qu'elle ne rentre dans la cellule (Mah et al., 2003).

III.4 L'acquisition de gènes de résistance

La composition du génome des bactéries est fortement influencée par l'environnement et peut être remodelée selon différents mécanismes, comme les mutations, la recombinaison, ou le transfert horizontal, c'est-à-dire, le transfert d'ADN d'une cellule donneuse à une cellule réceptrice. Ce dernier est d'ailleurs très présent dans les biofilms et ce pour plusieurs raisons : *i)* le biofilm est caractérisé par une forte densité bactérienne qui favorise le contact entre les bactéries, ce qui augmente fortement les probabilités de transferts horizontaux et *ii)* la matrice est une source majeure d'ADN que les bactéries peuvent intégrer dans leur génome par transformation.

L'environnement au sein du biofilm est également favorable au maintien des gènes acquis dans la population et en particulier les plasmides. Ces petits fragments d'ADN circulaires et extra chromosomiques passent d'une cellule à une autre par conjugaison. En mode de vie planctonique, les plasmides sont répliqués et transmis à la descendance lors de la division cellulaire. Cependant lorsque la fréquence de division bactérienne est au plus haut, le risque de perte du plasmide est élevé. À l'inverse, en mode biofilm la probabilité de perdre le plasmide est faible car une majorité des cellules sont métaboliquement moins actives et se divisent moins (O'Connell et al., 2006).

Compte-tenu du nombre de bactéries présentes dans le biofilm et de l'hétérogénéité de la population bactérienne, la diversité génétique est grande. Elle l'est plus encore lorsque ces échanges de gène se font dans un biofilm multi-espèces.

Les biofilms sont ainsi considérés comme des réservoirs majeurs de gènes liés à l'antibiorésistance.

Il faut ajouter à ces transferts horizontaux, la résistance naturelle de *P. aeruginosa* et les mutations spontanées. Ces deux points ne seront pas traités dans cette partie car ils ont déjà été abordés dans le chapitre 1 (cf Revue bibliographique - Chapitre 1 – Section VI.).

III.5 La tolérance face au système immunitaire

Les biofilms stimulent constamment le système immunitaire. Ils induisent des environnements hyper-inflammatoires néfastes pour l'intégrité tissulaire (Barton et al., 1976; Donlan & Costerton, 2002). Ces dommages, s'ils sont prolongés comme dans le cas d'une infection

chronique, provoquent des complications graves, jusqu'à la perte de fonction respiratoire dans le cas d'une infection pulmonaire ou de l'audition dans le cas d'une infection du conduit auditif.

Les leucocytes polynucléaires font partie des cellules du système immunitaire majoritairement recrutées lors d'une infection, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces leucocytes sécrètent des élastases, des collagénases et des radicaux de l'oxygène pour dégrader la matrice du biofilm. En revanche, ils sont incapables de phagocyter les bactéries présentes à l'intérieur de la matrice. En effet, la taille des agrégats formés par les bactéries peut atteindre facilement 5 µm, dépassant largement la capacité de phagocytose des leucocytes (Alhede et al., 2020).

P. aeruginosa sécrète des facteurs de virulence qui jouent un rôle majeur dans l'inactivation des cellules du système immunitaire. Parmi eux, les RLs lysent par nécrose les leucocytes ce qui libère de l'ADNe qui pourra être recyclé dans la matrice du biofilm (Jensen et al., 2007). Il a aussi été montré que la synthèse des rhamnolipides était augmentée en présence de leucocytes (Alhede et al., 2009).

III.6 Mini-Revue “The Biofilm Resistance: Many responses but Still Many Questions”, Biomedical Journal of Scientific & Technical Research

The Biofilm Resistance: Many Responses but Still Many Questions

Lisa Wallart, Emmanuelle Dé, Julie Hardouin Pascal Cosette and Thierry Jouenne*

CNRS UMR 6270 PBS, Université Rouen Normandie, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France

*Corresponding author: Thierry Jouenne, CNRS UMR 6270 PBS, Université Rouen Normandie, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France

ARTICLE INFO

Received: 📅 July 03, 2023

Published: 📅 July 19, 2023

Citation: Lisa Wallart, Emmanuelle Dé, Julie Hardouin Pascal Cosette and Thierry Jouenne. The Biofilm Resistance: Many Responses but Still Many Questions. Biomed J Sci & Tech Res 51(4)-2023. BJSTR. MS.ID.008133.

ABSTRACT

Microbial biofilms (i.e., bacterial and fungal) are often very deleterious due to their exceptional tolerance to treatments, in particular to conventional antimicrobials therapy. The processes involved in this low efficacy of antimicrobials on adherent cells have been widely studied in the last decades. It is now accepted that this tolerance of sessile cells is multiparametric. It involves different mechanisms, physico-chemical and biological. A major characteristic of biofilm microorganisms is that they are subjected to very deleterious environmental conditions which induce in them a large number of stress response mechanisms, some of which are obviously involved in this tolerance. On the other hand, few resistance systems, specifically expressed by sessile cells, have been described so far. Moreover, the fact that most natural and clinical biofilms are polymicrobial raises questions about the relevance of some observations obtained on monocultures.

Keywords: Biofilm; Resistance; Antimicrobials; Antibiotics

Abbreviations: EPS: ExoPolymers; eDNA: Extracellular DNA ; MIC: minimum inhibitory concentration; SCVs: small colony variants; QS: Quorum sensing; TCS: Two Component System

Mini Review

It is well known that biofilm infections are difficult to eradicate, adherent cells (bacteria and yeasts) exhibiting antimicrobial resistance increases of up to 200 times, as compared with planktonic counterparts [1,2]. These biofilms are thus the primary cause of failures in the implantation of medical devices, which generate high morbidity and mortality [3]. This resistance is actually more of a tolerance than a real resistance; indeed, it is essentially induced by an adaptation of the microorganisms, a reversible phenotype which switches back in the planktonic mode [4,5]. Resistance, on the other hand, generally involves an increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antimicrobial, due to an irreversible change in the microorganism through a mutation, or resistance acquired via horizontal gene trans-

fer. The low efficacy of antimicrobials on biofilms is clearly multiparametric [6] and implies both tolerance and resistance of adherent cells, in particular due to the high heterogeneity of the sessile cell physiology [7] due to gradients instauration within these structures [8].

Tolerance of Biofilms to Inhibitors

The mechanisms involved in the tolerance of biofilms are multiple [9-11] and include a low diffusivity of antimicrobials within the polymer matrix [12], a lower sensitivity to phagocytosis and other mechanisms put in place by the immune system of the host [13], a low growth rate of the microorganisms (dormancy), metabolic alterations, environmental gradients within the biofilm, and the presence of persister cells (Table 1).

Table 1: Main mechanisms involved in the tolerance of fungal and bacterial biofilms.

Mechanism Involved	Effect	References
Low penetration of the antimicrobial	Decrease of the local concentration of the antimicrobial	[15,16]
Low growth rate	Decrease of the efficacy of some antimicrobials (dormancy)	[19-21]
Metabolism alterations	Accumulation of proteins involved in adaptation, target modifications	[25,26]
Oxygen gradient	Decrease of the efficacy of some antimicrobials (intracellular penetration, dormancy)	[33-35]
Presence of persisters	Decrease of the efficacy of some antimicrobials (dormancy)	[37-38]
Quorum sensing	Activation of efflux pumps	[43]
Stress responses	Cross-resistance against antimicrobials	[50]

A Diffusional Resistance to Inhibitors

Due to its structural and mechanical properties, the polymer matrix constitutes the first defense against antimicrobial agents. It consists mainly of water, ions and ExoPolymers (EPS) in both fungal [11] and bacterial [14] biofilms. These EPS are essentially exopolysaccharides, protein lipids, but also extracellular DNA (eDNA). Due to their physico-chemical properties, EPS act as a filtering barrier, either by interaction with the compound (due to the presence of negative charges), or by trapping. Positively charged antibiotics, such as aminoglycosides, will thus bind to a negatively charged matrix, which will limit their diffusion within the biofilm [15]. Chlorine, commonly used as a disinfectant, penetrates weakly into a mixed biofilm of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* [16]. Nevertheless, the limitation of the inhibitor diffusion in this gangue cannot alone explain the extraordinary resistance of biofilms. Thus, for example, an antibiotic such as the vancomycin, which diffuses correctly within the biofilm, is just as ineffective on sessile bacteria [17]. Likewise, fluoroquinolone antibiotics efficiently penetrate within *P. aeruginosa* biofilms [18,19].

A Low Growth Rate

Within biofilms, it exists heterogenous microenvironments corresponding to areas deficient in nutrients, oxygen or with extremely low local pH values [8,20]. Many studies show that microorganisms (yeasts [21] and bacteria [22]) display, within biofilms, a low growth rate and a phenotype close to, but different [23], from cells in the stationary phase of growth. This dormancy partially explains the ineffectiveness of antifungals [21] and antibiotics [22,24] on biofilm cells.

An Alteration of the Cellular Metabolism

It is now well recognized that the "biofilm" phenotype reflects alterations in the gene expression of adherent cells, leading to the activation of some metabolic pathways, in particular in the deeper zones of the biofilm, whereas these alterations are weaker in the more peripheral regions [24,25]. These changes in metabolism reflect adaptations of the microorganisms to the environmental conditions they encounter and explain some tolerances to inhibitors. Thus, local deficiencies in amino acids, such as leucine, cysteine and lysine,

have been shown to be responsible for the tolerance of *Escherichia coli* biofilms to ofloxacin [26]. The development of so-called "post-genomic" approaches, such as transcriptomic (consisting of identifying and quantifying the mRNAs expressed) and proteomic (consisting of identifying and quantifying the proteins expressed by a cell at a given time), allowed, in the recent decades, to draw up an inventory of the differences in gene expression in bacteria [27,28] and fungi [29-31] organized in biofilm and in suspension. However, significant differences were observed at the quantitative level between the proteomic and transcriptomic approaches. Thus, while proteomics suggests that a large number of proteins are expressed differently in bacteria in biofilms, i.e. between 15 and 50% proteome modifications, the results obtained by transcriptomic suggest that a small proportion of the genome (between 1 and 15%) shows significant changes in expression. These differences can of course be explained by the weak correlation between the quantity of mRNA and protein, but could also indicate the existence of key proteins which would not yet be identified because modified qualitatively and not quantitatively, via post-translational modifications such as phosphorylations and/or acetylations, for example [32]. Thus, Massier, et al. [33] reported significant differences in the phosphorylation rates of extracellular proteins in planktonic and sessile *Acinetobacter baumannii* cells. These authors also demonstrated that some phosphosites were located in key regions of proteins involved in antibiotic resistance, such as in betalactamases [33].

Oxygen Gradients

The oxygen tension is low in deep zones of the biofilms. This property has been demonstrated by using microelectrodes a little 20 years ago [34]. Thus, it has been shown that oxygen penetrates the first 50 microns of biofilms [35]. These oxygen-deficient areas contribute to the ineffectiveness of some antibiotics on bacterial biofilm [36-38]. For example, these anaerobic microenvironments directly impact the efficacy of aminoglycosides, including intracellular transport, which requires the presence of a protomotive force [39].

A Presence of Persisters

Within biofilms, there is also a high proportion of persistent cells called persisters, corresponding to a subpopulation of dormant cells,

which do not divide, and that are highly adapted to resist against various stresses. These persisters are found in both bacterial [40] and fungal [41] biofilms. These cells represent less than 1% of the original population and their genome is identical to that of their congeners. Different mechanisms are involved in their formation [9 and cited references]. The slow metabolism of these cells makes them less sensitive to antibiotics compared to cells in the exponential or even stationary growth phase [42]. Persisters contribute significantly to the difficulty encountered in eradicating biofilm infections such as chronic urinary and pulmonary infections. The biofilm is in fact a very favorable protective niche for persisters [43]. When the antimicrobial treatment is stopped, the emergence of these bacteria from dormancy leads to the reformation of the biofilm and the recurrence of the infection [44]. These “persisters” differ from “small colony variants” (SCVs) which are found in high proportion within bacterial biofilms [40]. SCVs are adapted variants that grow poorly on standard culture media and therefore produce very small colonies. SCVs have been involved in the recurrence and persistence of chronic infections [43,44] and show a greater ability to adhere compared to “wild” bacteria in *Staphylococcus aureus* [40].

A Role of the Quorum Sensing

The Quorum sensing (QS) is a communication system between microorganisms, linked to cell density. It is based on the synthesis and accumulation in the extracellular medium of small molecules, called auto-inductors, playing the role of pheromones. QS is strongly involved in the formation and dispersion of bacterial [[45] and cited references] and fungal [[46] and cited references] biofilms, but less so in their resistance. However, it has been shown to play a role in the biofilm tolerance of *P. aeruginosa* through the activation of efflux pumps [47].

A Response to Stress

Many environmental stresses are known to induce resistance to antimicrobials in microorganisms [48]. The unfavorable environmental conditions prevailing within the biofilms will obviously cause significant stress on the sessile microorganisms. It has thus been shown that many genes involved in the stress response were strongly over-expressed in sessile bacteria [49] and yeasts [50]. In *Candida glabrata*, for example, the resistance of biofilms to oxidative stress has been correlated with the accumulation of proteins involved in the response to oxidative stress [51].

An Overexpression of Efflux Pumps

Efflux pumps allow cells to expel inhibitors from their cytoplasm [50]. The involvement of efflux pumps in the tolerance of sessile microorganisms is relatively controversial. Thus, some studies have shown no correlation between the tolerance of biofilms of *P. aeruginosa* and the expression of efflux pumps [52,53]. By contrast, Liao et al. suggested a possible correlation between the expression of efflux

pumps and the decreased sensitivity of *P. aeruginosa* biofilms [54]. Similarly, overexpression of efflux pumps has been described as involved in the tolerance of *C. albicans* biofilms [[9] and references cited]. However, this involvement could be temporary and not concern mature biofilms [10], suggesting the role of other mechanisms such as genes and operons specifically involved in biofilm resistance. Few resistance mechanisms specifically set up by adherent bacteria have been described until now. Among these, it has been demonstrated in *P. aeruginosa* the production and accumulation in the periplasm of biofilm bacteria, of small cyclic sugar polymers able to trap aminoglycosides [55]. The production of these polymers is under the control of the *ndvB* gene which encodes a glucosyltransferase. This gene is specifically over-expressed from the first minutes following the bacterial adhesion. The PA0756-PA0757 proteins are the two elements of the first two component system (TCS) described as specifically involved in the biofilm resistance to antibiotics, in particular to ciprofloxacin [56] while these TCS were already strongly known to be involved in the biofilm formation [[57] and references cited] Similarly, still in *P. aeruginosa*, a cluster of 4 genes, called *bac* for *biofilm associated cluster*, has been identified, coding for proteins with unknown functions. This proteic system seems involved in the biofilm formation, in the sessile bacteria virulence but also in the resistance to tobramycin [58].

Polymicrobial Biofilms

In nature, biofilms are often polymicrobial [59]. In the medical field, chronic infections are also frequently caused by multispecies biofilms, sitting in different sites [see [59] and references therein]. Emerging evidence suggests that a lot of interspecies interactions occur in these complex communities, leading to therapeutic failures [60]. In all these communities, the biological interactions are complex and are most often defined according to the result of the interaction on each of the two participating species: they can be commensal type or, on the contrary, parasitic or even mutualistic. Regardless of the consequences for each species, these interactions can lead to an acceleration and aggravation of the disease [61,62]. We can then speak of synergy between bacterial species, which can result, for example, by an increase in the production of virulence factors or even by an increase in the tolerance of species to certain antibiotics [62]. This antimicrobial tolerance can be developed by different mechanisms [63], e.g., horizontal gene transfer [64], production of β -lactamases [65], of primary metabolites [66,67] and/or of QS molecules [68] which protect neighbors, even against environmental stresses [69]. In a contradictory way, it has been shown that *P. aeruginosa* became more susceptible to ampicillin when in the presence of a drug-sensitive anaerobic community than in monoculture [70], pointing out that polymicrobial interactions can produce different antibiotic sensitivity profiles. Though polymicrobial biofilms may associate eukariotic and procaryotic organisms, it is clear that most studies are still today performed on bacterial pathogens. Nevertheless, it has been reported

that the biofilm matrix produced by *C. albicans* modify the structure of polymicrobial biofilms and lead to altered sensitivity of bacterial species to antibiotics [71,72]. The farnesol, a quorum sensing molecule produced by *C. albicans*, has also been shown to be able to protect *S. aureus* from vancomycin within a polymicrobial biofilm [73].

Conclusion

The resistance of microorganisms in biofilms is obviously complex and multiparametric, even if one can consider the existence of different stresses encountered by sessile cells as a common denominator. The massive doses of antimicrobial agents that would be required to eradicate them are incompatible with environmental requirements and medical reality. The fight against biofilms therefore requires new antibacterial control strategies. Among these, we can cite the search for new molecules that are more effective on adherent bacteria. This approach requires upstream a better knowledge of the molecular mechanisms specifically mobilized in this resistance, which would constitute new therapeutic targets. It is also clear that interspecies interactions modulate the sensitivity of polymicrobial communities in unpredictable ways, data obtained on monospecies cultures being not able to be extrapolated to polymicrobial structures. Better understanding these interactions is obviously an important challenge in the near future in order to better fight against polymicrobial biofilm infections.

References

- Naparstek L, Carmeli Y, Navon Venezia S (2014) Biofilm formation and susceptibility to gentamycin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 69(4): 1027-1034.
- Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM (2021) Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol* 131(1): 11-22.
- Singh A, Amod, A Pandey, P Pranay B, M Shivapriya Pingali, et al. (2022) Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. *Biomed Mater* 17(2).
- Lebeaux D, Ghigo JM (2012) Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med/scie* 28(8-9): 727-739.
- Mah TF (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol* 7(9): 1061-1072.
- Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276): 135-138.
- Mah TF (2012) Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies. *J Bacteriol* 194(18): 4791-4792.
- Jeanyoung J, Price-Whelan A, Dietrich LEP (2022) *Nat Rev Microbiol* 20: 593-607.
- Ohlsen I (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(5): 877-886.
- Mathé L, Van Dijk P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet* 59(64): 251-264.
- Kaur J, Nobile CJ (2023) Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 71: 102237.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. *Antimicrob. Agents Chemother* 27(4): 619-624.
- Hänsch GM (2012) Host defence against bacterial biofilms: "Mission impossible"? *ISRN Immunol*.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13(1): 20-26.
- Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, et al. (2008) Biofilm penetration, triggered release and *in vivo* activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Antimicrob Chemother* 61(4): 859-868.
- Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* 91(3): 525-532.
- Dunne WM, Mason EO, Kaplan SL (1993) Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother* 37(12): 2522-2526.
- Suci PAK, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 38(9): 2125-2133.
- Vrany JD, Stewart PS, Suci PA (1997) Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother* 41(6): 1352-1358.
- De Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol Bioeng* 53(2): 151-158.
- Baillie GS, Douglas LJ (1998) Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42(8): 1900-1905.
- Ander JF, Zahller J, Roe F, Stewart PS (2003) Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1251-1256.
- Collet A, Cossette P, Beloin C, Ghigo, Christophe Rihouey, et al. (2008) Impact of *rpoS* deletion on the proteome of *Escherichia coli* grown as biofilm. *J Prot Res* 7(1): 4659-4669.
- Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ (2003) Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 47(1): 317-323.
- Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin M, Arne Heydorn, et al. (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70(10): 6188-6196.
- Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Guillaume Soubigou, et al. (2013) Starvation, together with the SOS response mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *Plos Genet* 9(1): e1003144.
- Folsom JP, Richards L, Pitts B, Roe F, Garth D Ehrlich, et al. (2010) Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology* 10: 294.
- Khemiri A, Jouenne T, Cossette P (2016) Biofilmology and proteomics approaches : what have we learned from a decade of research. *Med. Microbi-*

- ol. *Immuno* 205(1): 1-19.
29. Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y (2010) Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics* 10(7): 1444-1454.
 30. Abdulghani M, Iram R, Chidrawar P, Bhosle K, Kajal Bhosle, et al. (2022) Proteomic profile of *Candida albicans* biofilm. *J Prot* 265: 104661.
 31. Zarnowski R, Sanchez H, Jaromin A, Zarnowska U, Aaron P Mitchell, et al. (2022) A common vesicle proteome drives fungal biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(38): 2211424119.
 32. Gaviard C, Jouenne T, Hardouin J (2018) Proteomics of *Pseudomonas aeruginosa*: the increasing role of post-translational modification. *Exp Rev Proteomics* 15(9): 757-772.
 33. Massier S, Robin B, Mégroz M, Wright A, John D Boyce, et al. (2021) Phosphorylation of Extracellular Proteins in *Acinetobacter baumannii* in Sessile Mode of Growth. *Frnsont Microbiol* 12: 738780.
 34. Xu KD, Stewart PS, Xia F, Huang CT (1998) Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* 64(10): 4035-4039.
 35. Stewart PS, Zhang T, Xu R, Pitts B, Frank Roe, et al. (2016) Reaction-diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2: 16012.
 36. Tresse O, Jouenne T, Junter GA (1995) The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 36(3): 521-526.
 37. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Garth D Ehrlich, et al. (2004) Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2659-2664.
 38. Webster CM, Shepherd M (2022) A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. *World J Microbiol Biotechnol* 39(1): 7.
 39. Taylor P, Yeung ATY, Hancock REW (2014) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol* 191: 121-130.
 40. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2009) Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J Med Microbiol* 58(pt 8): 1067-1073.
 41. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50(11): 3839-3846.
 42. Miyaue S, Suzuki E, Komiyama Y, Kondo Y, Miki Morikawa, et al. (2018) Bacterial memory of persisters bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front Microbiol* 26: 1396.
 43. Lewis K (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*, p. 48-56.
 44. Neut D, Van der Mei HC, Bulstra SK, Bussher HJ (2007) The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *ACTA Orthop* 78(3): 299-308.
 45. Zhou L, Zhang Y, Ge Y, Zu X (2020) Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Front Microbiol* 15: 589640.
 46. Zhao X, Yu, Ding T (2020) Quorum sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms* 8(3): 425.
 47. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmølle M, Morten Hentzer, Janus AJ Haagen, et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. *Microbiology* 151(2): 373-383.
 48. Dawan J, Ahn J (2022) Bacterial resistance responses as potential targets in overcoming antibiotic resistance. *Microorganisms* 10(17): 1385.
 49. Rahman MA, Amirkhani A, Chowdhury D, Mempo M, Karen Vickery, et al. (2022) Proteome of *Staphylococcus aureus* biofilm changes significantly with aging. *Int J Mol Sci* 23(12): 6415.
 50. Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y (2008) *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* 8(14): 2936-2947.
 51. Van Acker H, Coenye T (2016) The role of efflux and physiological adaptation in biofilm tolerance. *J Biol Chem* 291(24): 12565-12572.
 52. Pitts L, Roe B, Ehrlich F, Parker GD (2010) Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiol* 10: 294.
 53. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson K S, Folsom J P, Boegli L, et al. (2015) Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 59(7): 3838-3847.
 54. Liao J, Schurr MJ, Sauer K (2013) The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 195(15): 3352-3363.
 55. Mah TF, Pitts B, Pellock B (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426(6964): 306-310.
 56. Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R (2013) Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *Plos One* 8: e61625.
 57. Sultan M, Arya R, Kim KK (2021) Role of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Int J Mol Sci* 22(22): 12152.
 58. Macé C, Seyer D, Chemani C (2008) Identification of biofilm-associated cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation and virulence. *Plos One* 3(12): 110 e3897.
 59. Exton B, Hassard F, Vaya AM, Grabowski RC (2023) Polybacterial shift in benthic river biofilms attributed to organic pollution – a prospect of a new biosentinel? *Hydrol Res* 54(3): 348-359.
 60. Anju VT, Busi S, Imchen M, Kuavath R (2022) Polymicrobial infections and biofilms: clinical significance and eradication strategies. *Antibiotics* 11(12): 1731.
 61. Marchaim D, Perez F, Lee J, Bheemreddy S (2012) "Swimming in resistance": Cocolonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control* 40(9): 830-835.
 62. Nguyen AT, Oglesby Sherrouse AG (2016) Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-cultivations and polymicrobial infections. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(14): 6141-6148.
 63. Orazi G, O'Toole GA (2020) "It takes a village": mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms. *J Bacteriol* 202(1): e00530-19.
 64. Tanner WD, Atkinson RM, Goel RK, Toleman MA (2017) Horizontal transfer of the bla_{NDM-1} gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 364(8): fnx048.
 65. Liao YT, Kuo SC, Lee YT, Chen CP (2014) Sheltering effect and indirect pathogenesis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in poly-

- microbial infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58(7): 3983-3990.
66. Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, Hirata T (2005) Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55(4): 1113-1126.
 67. Kim KS, Lee S, Ryu CM (2013) Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nat Commun* 4: 1809.
 68. Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, Watt SA (2008) Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 68(1): 75-86.
 69. Demeneç L, Cain AK, Dawson CJ, Liu Q (2023) Cross-protection and cross-feeding between *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* promotes their coexistence. *Nat Commun* 14(1): 702.
 70. Adamowicz EM, Flynn J, Hunter RC, Harcombe WR (2018) Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities. *ISME J* 12(11): 2723-2735.
 71. Harriott MM, Noverr MC (2009) *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* from polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 53(9): 3914-3922.
 72. Kong E, Tsui C, Kuchariková S, Andes D (2016) Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. *mBio* 7(5): e0165-16.
 73. Kong EF, Tsui C, Kuchariková S, Van Dijk P (2017) Modulation of *Staphylococcus aureus* response to antimicrobials by the *Candida albicans* quorum sensing molecule farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* 61(12): e1573-17.

ISSN: 2574-1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2023.51.008133

Thierry Jouenne. Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>



Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<https://biomedres.us/>

Comme décrit dans ce chapitre et dans la mini-revue, l'ensemble de ces mécanismes rend difficile l'éradication des biofilms dans un contexte infectieux. Les antibiotiques restent peu efficaces et leur utilisation à fortes concentrations, outre une toxicité possible, amènera à terme à l'émergence de bactéries résistantes. Cette faible sensibilité des biofilms aux traitements complique gravement la prise en charge des patients infectés et mène parfois à l'échec thérapeutique. La communauté scientifique fait donc face à un vrai problème de santé publique à l'échelle mondiale. Il devient en conséquence urgent de trouver de nouvelles stratégies anti-biofilms dans le but d'inverser cette tendance.

IV. Les récentes avancées de la recherche dans la lutte contre les biofilms

À ce jour, et malgré l'antibiorésistance, les approches utilisées s'appuient encore sur les antibiotiques, soit en prévention soit en curatif. Ces derniers permettent une diminution de la charge bactérienne et une disparition transitoire des symptômes, mais ils ne permettent jamais une éradication complète du biofilm.

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* par antibiothérapie doit prendre en compte plusieurs paramètres. Le premier concerne le profil de résistance de la bactérie qui permet de choisir le(s) antibiotique(s) adapté(s). Ce dernier est obtenu par antibiogramme ou mesure de la CMI (concentration minimale inhibitrice). Alors que l'antibiogramme reflète un profil « sensible » ou « résistant », la CMI permet de déterminer la concentration en antibiotique à partir de laquelle la croissance bactérienne est inhibée. Il est aussi possible de déterminer la CMB (concentration minimale bactéricide) qui est la concentration de l'antibiotique à partir de laquelle la population bactérienne est éradiquée. Le deuxième paramètre à prendre en compte concerne les facteurs de risque liés à l'hôte. Ces facteurs peuvent être des terrains favorables aux récives et à la comorbidité des infections chroniques. Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte est le site infecté.

Les mesures d'hygiène durant une opération chirurgicale sont un premier moyen de prévention mais il est impossible d'obtenir une asepsie totale. Environ 5% des matériaux implantés sont ainsi des sources d'infections aux biofilms (Lebeaux & Ghigo, 2012).

Afin de limiter ces infections nosocomiales, de nombreuses stratégies visant à rendre ces matériaux anti-biofilms sont aujourd'hui proposées (Blackman et al., 2019, 2021; Song et al., 2016). Cependant, très souvent, une guérison définitive impose l'exérèse de l'implant (Darouiche, 2004).

Dans le cas de patients porteurs de cathéters sur de longues périodes et/ou de sujets à risques, il est possible d'employer la stratégie « lock therapy ». Elle consiste à injecter en continue pendant 12 à 24 heures, une forte concentration d'antibiotique à travers la lumière du cathéter. À noter que cette stratégie favorise grandement l'émergence de germes

résistants, c'est pourquoi elle est réservée à un nombre restreint de patients (Landry et al., 2010).

Une stratégie régulièrement employée notamment chez les patients atteints de mucoviscidose est l'usage d'une double antibiothérapie dès la colonisation de *P. aeruginosa* et avant l'installation de l'infection chronique (Høiby et al., 2015; Skov et al., 2019)

Côté recherche, de nombreux laboratoires mènent des études visant à rechercher des molécules anti-biofilms. On retrouve ainsi des stratégies basées sur l'inhibition du QS, la perméabilisation de la membrane, le clivage du peptidoglycane, l'inhibition de la division cellulaire, la dispersion du biofilm par ajout d'enzyme exogène, l'inhibition du c-di-GMP, l'inhibition de la capture du fer ou encore l'inhibition de l'adhésion par modification de surface (Chamsaz et al., 2017; Chauhan et al., 2014; Triandafillu, 2003).

Le principe d'inhibition du QS appelé quorum quenching, repose sur l'utilisation d'analogues structuraux aux molécules signal du QS (Hentzer & Givskov, 2003). Des études ont montré que l'azithromycine altère significativement la communication chez *P. aeruginosa in vitro* et *in vivo* (Das et al., 2016; Hoffmann et al., 2007; Saiman et al., 2003). En revanche, son activité immunogène chez l'Homme est mal connue (Feola et al., 2010). Une autre étude, utilisant cette fois-ci le furanone (analogue structurale des HSLs) a montré une inhibition du système Rhl et par conséquent une réduction de la production des facteurs de virulence (Hentzer et al., 2002).

La dégradation de la matrice par l'ajout d'enzymes exogènes donne aussi des résultats encourageants. L'action anti-biofilm de la dispersine-B a notamment été montrée dans le cas d'infections de grands brûlés par les pathogènes du groupe ESKAPE (Gawande et al., 2014). La dispersine-B est produite initialement par *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pour dégrader sa propre matrice (Kaplan et al., 2003). Une autre enzyme appelée DNase-I, cible l'ADNe des biofilms mono ou multi-organismes (Pirlar et al., 2020). Cette enzyme est d'ailleurs prescrite en médicament (Dornase) sous forme nébulisée chez les patients atteints de mucoviscidose afin de prévenir l'apparition d'une infection chronique à *P. aeruginosa*, de réduire la viscosité du mucus et augmenter sa clairance (C. Yang & Montgomery, 2018).

Ces deux chapitres ont abordé de façon non exhaustive, les connaissances acquises sur *P. aeruginosa*. Les nouvelles techniques scientifiques développées au fil des années ont été un vrai moteur pour la microbiologie. Aujourd'hui, ce sont les recherches basées sur des combinaisons de différentes analyses de type « omique » qui connaissent un fort engouement (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique). Ces sciences ont participé et participeront encore à l'identification et à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence, la résistance et l'adaptabilité des microorganismes.

Projet de recherche

L'équipe BRICS du laboratoire PBS étudie la physiologie des bactéries organisées en biofilms en utilisant plus particulièrement des approches protéomiques. C'est dans ce contexte qu'une étude protéomique à large échelle visant à comparer le protéome de bactéries immobilisées et planctoniques a été menée sur la souche PAO1 par le Dr. Sébastien Vilain. Cette étude a montré une accumulation d'une quarantaine de protéines chez les bactéries immobilisées, appuyant une nouvelle fois l'hypothèse d'un protéome spécifique au biofilm (Vilain et al., 2004). C'est à partir de cette étude que plusieurs travaux se sont succédés.

Ce groupe de protéines a d'abord fait l'objet d'une étude par mutagenèse ciblée par le Dr. Damien Seyer (Seyer, 2006). Puis, à la suite de différents tests phénotypiques réalisés en lien avec la formation de biofilm, c'est la souche mutée sur le gène *pa3731* (nommée $\Delta pa3731$) qui a été sélectionnée pour la suite des travaux. À ce stade, la protéine PA3731 est de fonction inconnue car elle n'avait auparavant jamais été étudiée, c'est pourquoi elle porte simplement le nom du gène qui la code.

Pour élucider la fonction de PA3731, des études phénotypiques complémentaires furent menées sur la souche $\Delta pa3731$ par le Dr. Camille Macé, démontrant son implication dans la formation de biofilm. Le gène *pa3731* est entouré de gènes codant pour des protéines elles aussi de fonction inconnue. Ces gènes voisins furent inclus dans l'étude et le cluster ainsi formé est constitué des gènes suivants : *pa3732*, *pa3731*, *pa3730* et *pa3729*. D'après les phénotypes observés chez la souche $\Delta pa3731$, ce cluster fût nommé BAC pour Biofilm Associated Cluster (Macé et al., 2008).

Ce cluster fût ensuite étudié successivement par le Dr. Mohamed Amine Ben Mlouka et le Dr. Brahim Saffiedine, qui travaillèrent respectivement sur la souche PA14 et PAO1 (Ben Mlouka, 2014; Saffiedine, 2019). À l'image des phénotypes observés chez $\Delta pa3731$, la mutation des autres gènes du système, à l'exception du gène *pa3729*, induit une diminution de la formation de biofilm, de la sécrétion de rhamnolipides, du swarming et de l'adhésion sur les cellules pneumocytaires A549. Ces phénotypes similaires entre les différents mutants et les interactions observées entre certaines de ces protéines appuient l'hypothèse que ces 4 protéines fonctionneraient en système.

De plus, les localisations des protéines BAC au sein de la bactérie ont été investiguées par une approche de fractionnement couplée à une identification par spectrométrie de masse de chacun des compartiments (Ben Mlouka, 2014). La protéine PA3731 a été localisée dans tous les compartiments tandis que PA3732 a été localisée dans la membrane interne. Alors que PA3729 semble résider dans la membrane externe la protéine PA3730 n'a pas été retrouvée.

Pour faciliter la lecture, les protéines ont été renommées selon le **Tableau 2**.

Tableau 2 Les annotations génomiques et le nom des protéines BAC.		
Nom du gène chez PAO1	Nom du gène chez PA14	Nom de la protéine
<i>pa3732</i>	<i>PA14_16140</i>	BacA
<i>pa3731</i>	<i>PA14_16150</i>	BacB
<i>pa3730</i>	<i>PA14_16160</i>	BacC
<i>pa3729</i>	<i>PA14_16180</i>	BacD

Au regard des phénotypes touchés à la suite d'une mutation d'un des gènes du système BAC (à l'exception de *pa3729*) ce dernier fût supposé participer à la sécrétion de rhamnolipides (**Figure 28**, à gauche). Aussi, d'après l'homologie entre BacB et PpsA, une protéine impliquée dans la réponse au stress chez *E. coli*, la seconde hypothèse concernait une probable transmission d'un signal de stress à travers les différents acteurs Bac (**Figure 28**, à droite).

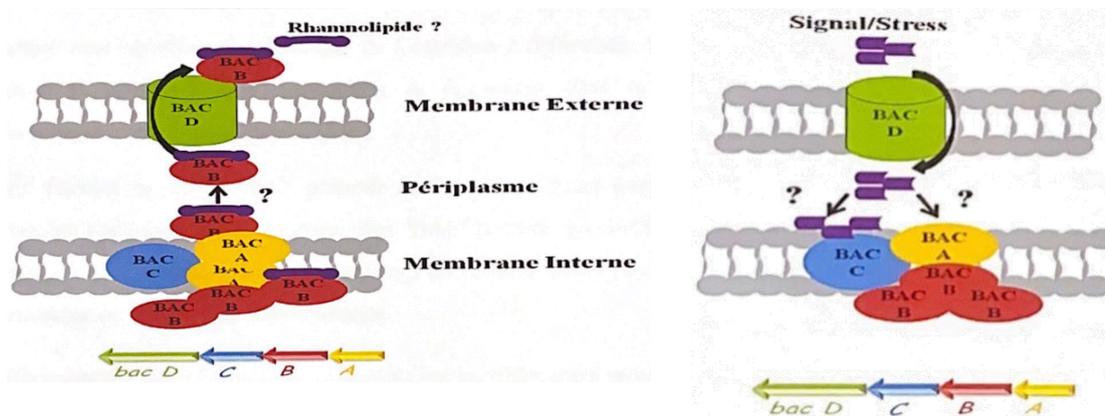


Figure 28 | Les hypothèses du fonctionnement du système BAC.
(Ben Mlouka, 2014)

Mon projet de recherche s'inscrit dans la continuité de ces études avec comme objectif général la caractérisation de la fonction des protéines du système BAC.

Les travaux précédents se sont effectués à la fois chez PAO1 et PA14 démontrant que le système BAC est homologue entre ces deux souches (**Figure 29**).

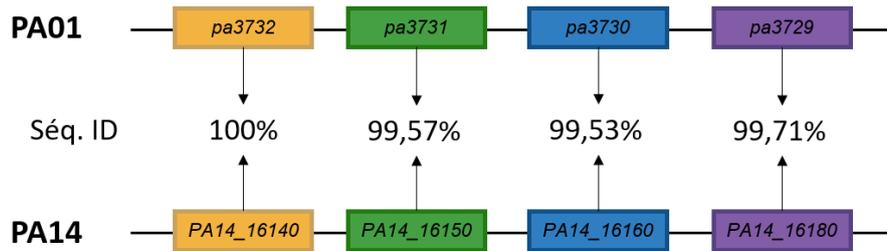


Figure 29 | Homologie des gènes du système BAC chez PA01 et PA14.

Alignement réalisé avec Clustal Omega. Les séquences ont été récupérées à partir de la base de données Pseudomonas Genome Database (www.pseudomonas.com). Le pourcentage d'identité a été calculé avec le logiciel Jalview.

Les travaux présentés ont été réalisés sur la souche PA14, souche connue pour sa forte pathogénicité et sa capacité à former des biofilms épais. Dans les parties suivantes, les protéines du système seront nommées selon leur nomenclature présentée dans le **tableau 2**.

Les résultats présentés ci-dessous sont divisés en 3 parties, la troisième étant divisée en deux chapitres :

Partie 1 : Étude approfondie de la protéine BacA

Partie 2 : Analyse bio-informatique approfondie, lien avec la littérature et tentative d'annotation fonctionnelle des protéines BAC

Partie 3 : Explorations préliminaires des protéines BacB et BacD

- Partie 3 – Chapitre 1 : La protéine BacB
- Partie 3 – Chapitre 2 : La protéine BacD et premières investigations des lipid rafts de *P. aeruginosa*

Partie 1 :
Étude approfondie de la
protéine BacA

I. Contexte et objectifs de l'étude

Les travaux du Dr. Camille Macé sur la protéine BacB, ont démontré son implication dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Il s'avère aussi que cette protéine partage des similitudes avec la protéine PspA (Phage shock protein A) d'*E. coli* (Macé et al., 2008). La protéine PspA fait partie du système Psp, un système de réponse au stress d'enveloppe cellulaire ou CESR (cell envelope stress response). La protéine PspA a été nommée ainsi, suite à son accumulation lors d'une infection par des phages filamenteux (Brissette et al., 1990). Depuis, 6 autres protéines ont été découvertes et le système formé par ces dernières a conservé le nom « Psp ». Le système Psp est donc composé de 7 protéines : PspA, B, C, D, E, F et G. Les cinq premières sont codées en opéron nommé *pspABCDE* tandis que PspF et PspG sont codées respectivement par *pspF* et *pspG*.

Lorsque l'on compare les autres protéines BAC aux protéines du système Psp, aucune homologie de séquence n'est retrouvée.

Lors de ses travaux de thèse, le Dr. Saffiedine a mis en évidence de fortes interactions entre les protéines BacA et BacB (Saffiedine, 2019). Mes travaux de thèse se sont donc, dans un premier temps, centrés sur la protéine BacA.

L'étude de BacA a débuté par des tests phénotypiques en lien avec la formation de biofilm en utilisant une souche déficiente pour le gène *PA14_16140* (nommée par la suite $\Delta bacA$). Cette souche provient d'une collection de mutants disponible au PBS. Cette collection a été créée grâce à l'insertion d'un transposon (Liberati et al., 2006). Avant toute étude, la bonne insertion de ce dernier dans le gène *PA14_16140* a été vérifiée.

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans les phénotypiques observés dans cette étude, le protéome total de la souche WT cultivée en biofilm a été comparé à celui de la souche $\Delta bacA$. Cette étude protéomique quantitative a été effectuée selon une approche label-free (**Figure 30**). Les peptides ont été analysés par nLC-MS/MS grâce au spectromètre de masse Q-Exactive Plus. La quantification et l'identification des protéines ont été effectuées grâce au logiciel Progenesis. Les spectres MS/MS sont utilisés pour l'identification tandis que les cartes peptidiques (temps de rétention en fonction du rapport m/z) ont été comparées pour la quantification.

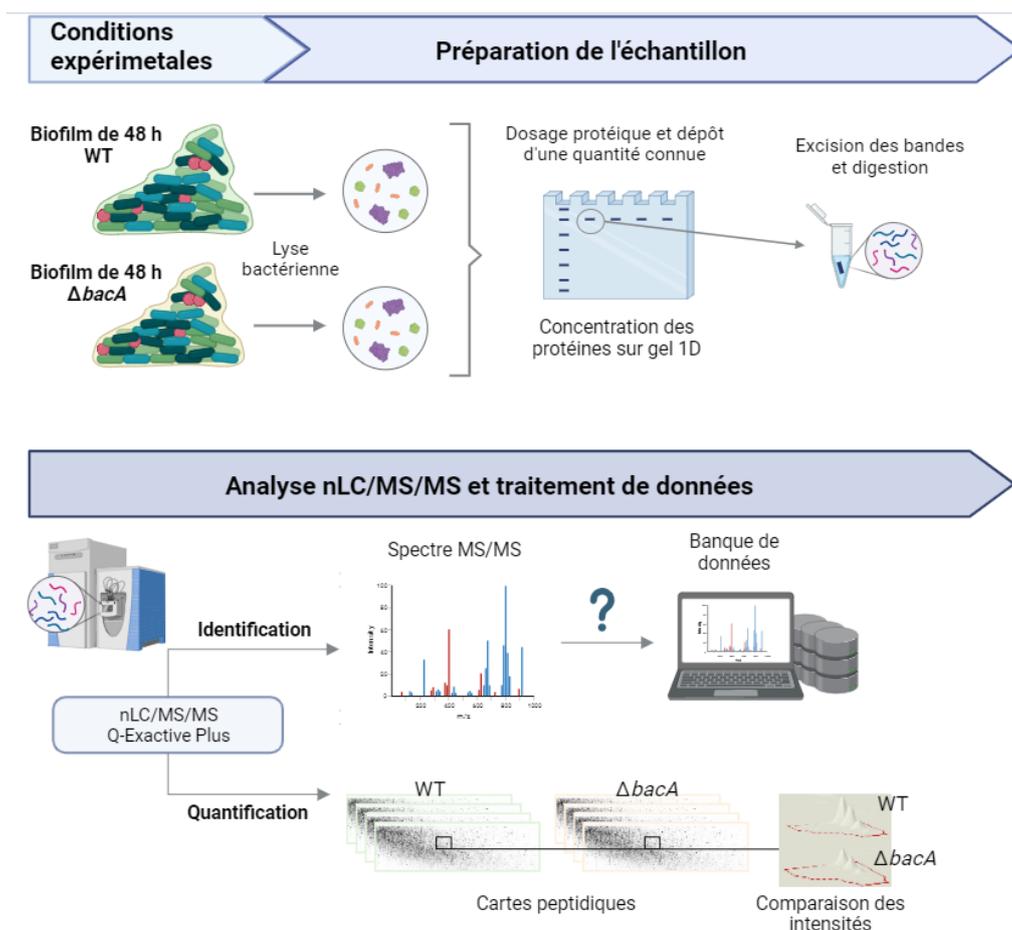


Figure 30 | Stratégie employée pour l'étude quantitative du protéome des biofilms formés par la souche WT et $\Delta bacA$ selon l'approche label-free.

Sur un total de 1702 protéines identifiées, environ 200 ont présenté des différences d'abondances significatives entre les deux souches. L'étude approfondie du jeu de données, a mis en lumière un groupe de protéines dérégulées pouvant expliquer les phénotypes observés. En parallèle, d'autres protéines significativement dérégulées nous ont aussi permis de formuler deux nouvelles hypothèses concernant le système BAC. La première concerne son organisation génétique et la seconde concerne le rôle de BacA. Pour confirmer la première hypothèse, une RT-PCR a été réalisée en collaboration avec la Dr. Marie-Christine KIEFFER-MEYER (Laboratoire GlycoMEV, Université de Rouen Normandie). Pour la seconde, nous avons d'abord mené une étude bio-informatique sur la protéine BacA puis réalisé une étude structurale par cristallographie, en collaboration avec la Dr. Isabelle BROUTIN (Laboratoire CiTCoM, UMR-8038 CNRS, Université Paris Cité).

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article intitulé « BacA : a possible regulator that contributes to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* » qui a été soumis dans le journal *Frontiers in Microbiology*.

II. Article : BacA : a possible regulator that contributes to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

BacA : a possible regulator that contributes to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

Lisa WALLART¹, Mohamed Amine BEN MLOUKA^{1,2}, Brahim SAFFIEDINE¹, Laurent COQUET^{1,2}, Hung LE^{1,2}, Julie HARDOUIN^{1,2}, Thierry JOUENNE¹, Gilles PHAN³, Marie-Christine KEIFFER-MEYER⁴, Eric GIRARD⁵, Isabelle BROUTIN³, Pascal COSETTE^{1,2,*}

¹ Polymers, Biopolymers, Surface Laboratory, UMR 6270 CNRS, Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

² HeRacLeS-PISSARO, INSERM US 51, CNRS UAR 2026, Normandie Univ, Mont-Saint-Aignan, France

³ CiTCoM, CNRS, Université Paris Cité, Paris, France

⁴ Glyco-MeV Laboratory, SFR NORVEGE FED 4277, Carnot I2C, IRIB, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen, France

⁵ IBS, UMR 5075 CEA CNRS UJF, Grenoble, France

*** Correspondence :**

Pr. P. Cosette

pascal.cosette@univ-rouen.fr

Keywords: *P. aeruginosa*; Biofilm; Rhamnolipids; Proteome; Crystallography; Psp system

Abstract

Previously, we identified in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm cells the accumulation of a hypothetical protein named PA3731 and showed that the deletion of the corresponding gene impacted its biofilm formation capacity. PA3731 belongs to a cluster of 4 genes (*pa3732* to *pa3729*) that we named *bac* system for “Biofilm Associated Cluster”. The present study focuses on the PA14_16140 protein, *i.e.*, the PA3732 (BacA) homolog in the PA14 strain. The role of BacA in rhamnolipid secretion, biofilm formation and virulence was confirmed by phenotypic experiments with a *bacA* mutant. Additional investigations allow to advance that the *bac* system involves in fact 6 genes organized in operon, *i.e.*, *bacA* to *bacF*, regulated by σ^{54} sigma factor. At a molecular level, quantitative proteomic studies revealed an accumulation of the BAC cognate partners by the *bacA* sessile mutant, suggesting a negative control of BacA towards the *bac* operon. Finally, a first crystallographic structure of BacA was obtained revealing a homologous structure to T3SS chaperones or/and regulatory proteins.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous Gram-negative bacterium that infects a broad spectrum of hosts, including plants, animals, and humans (He et al., 2004). This microorganism has become the most problematic human opportunistic pathogen in immunocompromised patients especially in burn victims (Azzopardi et al., 2014) and in cystic fibrosis patients (Folkesson et al., 2012; Murphy, 2009). *P. aeruginosa* causes severe nosocomial infections such as superinfections of surgical wounds, catheter-associated urinary tract infections, bacteraemia or ventilator-associated pneumonia. The pathogenicity of *P. aeruginosa* is multifactorial and mostly related to its ability to form biofilms. Indeed, this member of the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.) possesses a remarkable ability to evade the immune system and is also refractory to antibiotic therapies (Hoiby et al., 2011). Consequently, *P. aeruginosa* biofilm-related infections are associated with high morbidity and mortality.

Biofilms are bacterial communities embedded in a hydrated extracellular matrix (ECM) produced by the bacteria themselves. In environment, bacteria are most frequently found in biofilms, attached to biotic or abiotic surfaces, because biofilm lifestyle presents a clear physiological advantage compared to planktonic growth. ECM acts as a protective barrier against harsh environments, host immune system clearance, starvation and antibiotic therapy (Wallart et al., 2023). Furthermore, biofilms are favourable to horizontal transfer, as bacteria are clustered together. As a result of gene exchange, bacteria increase their genetic diversity and enrich themselves with new determinants, such as genes involved in antibiotic resistance (O’Connell et al., 2006). *P. aeruginosa* is therefore considered by the World Health Organization (WHO) as a Priority 1 pathogen that urgently requires the development of new antibiotics.

Using a proteomic approach, we previously identified a group of proteins accumulated in sessile *P. aeruginosa* PAO1 cells (Vilain et al., 2004), among which the protein of unknown function referenced as PA3731. Additional study, showed that $\Delta pa3731$ mutant possesses a biofilm-defective phenotype, correlated with a decrease in rhamnolipid (RHL) secretion, in swarming motility and in virulence. We also reported that the *pa3731* gene was surrounded by 3 genes coding for proteins of unknown function. This cluster (*pa3732* to *pa3729*) was named BAC system for “Biofilm Associated Cluster” (Macé et al., 2008). According to its predicted secondary structure, PA3731, (*i.e.*, BacB) is largely helical and shares similarities with the Phage shock Protein A (PspA), one of the proteins of the Psp system of *E. coli*, involved in the extra-cytoplasmic stress responses (Model et al., 1997). As for *psp* regulon, a putative σ^{54} -binding site upstream the *pa3732* (*bacA*) gene was identified and, as PspA, BacB was accumulated by an osmotic shock (Macé et al., 2008). However, some obvious differences were observed between the BAC and Psp systems, *e.g.*, no homology was found between the other proteins constituting the BAC system and Psp proteins, and BacB was not accumulated by a temperature shift from 37 to 50°C.

In accordance with a high level of genomic conservation between PAO1 and PA14 strains (Mikkelsen et al., 2011), the *bac* system is also present in PA14 and the sequences of the BAC proteins of PA14 are nearly identical to those of PAO1 (sequence identity above 99%). In PA14, the *bac* system involves genes from *PA14_16140* to *PA14_16180*.

In the present study, we focused on the role of the *PA14_16140* protein (*i.e.*, BacA homolog). Using a *bacA* mutant, we confirmed the involvement of this system in several phenotypes related to biofilm formation and virulence. Proteomic and crystallographic approaches allowed

to suggest the function of BacA as a chaperone/regulator of the *bac* system. By RT-PCR, we reviewed the genomic composition of the *bac* system, and showed that the genes encoding it were more numerous and organized in operon. Based on our current and previous results, the BAC system could be an original Psp system with a genomic environment divergent from that of the historical *E. coli* Psp system.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

P. aeruginosa PA14 wild-type (WT) and its derivative transposon $\Delta 16140$ mutant, named *bacA* mutant, were used. The mutant was obtained from a MAR2xT7 transposon mutant library which contains a gentamycin resistance cassette to ensure a selection pressure (Liberati et al., 2006). All bacterial precultures were performed in LB broth (Difco). For the $\Delta 16140$ strain, gentamycin was added at a final concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2 Phenotypic experiments

2.2.1 Planktonic growth kinetics

Free-cell cultures were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 mL of LB broth. Flasks were inoculated with fresh overnight culture at 10^7 CFU/mL and incubated at 37°C under shaking at 140 rpm. The cell population was monitored every 30 min by optical density measurements at 600 nm (OD_{600}) using a spectrophotometer (Cary 100 Bio, Varian). Data were expressed as mean values (\pm SEM) from at least three independent biological experiments.

2.2.2 Swarming motility

Swarming motility was performed according to a protocol already described (Ha et al., 2014). Briefly, plates contained 25 mL of M9 broth (Sigma-Aldrich) (supplemented with 0.2% glucose, 0.5% casamino acids, 1 mM MgSO_4) and 0.5% of technical agar (Difco). A 1,5 μL drop of fresh overnight precultures was placed in the center of the plate, touching the agar slightly. After 24 h at 37°C, the diameter (cm) of the circular zone of growth was measured. Data represent mean values (\pm SEM) from at least five independent biological experiments. Student's t-test was performed to evaluate the statistical significance of the observed differences.

2.2.3 Invading capacity and cytotoxicity experiments

A549 human lung adenocarcinoma cells from the American type Culture Collection (ATCC) were grown as monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) or in Ham's F-12 Nutrient Mixture for at least 20 days, to allow differentiation to an alveolar type II (ATII)-like phenotype, as indicated, supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum and antibiotics (100 U/ml of penicillin G and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin) (Cooper et al., 2016). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . All cell culture media and supplements were purchased from ThermoFisher Scientific.

Then, cells were trypsinized and transferred to 24-wells plate to get a monolayer of 10^5 cells per well. After 24 h of incubation under the same conditions, A549 cells were washed twice with 0,01 M phosphate buffer saline (PBS, Sigma-Aldrich), and fresh antibiotic-free medium was added. WT and $\Delta 16140$ strains were added into the culture medium at a ratio of bacteria to host cells of 100:1 (multiplicity of infection (MOI) of 100). Infected cells were incubated at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 for 2 h.

To determine the number of adherent bacteria, cells were washed twice with PBS, lysed with 0.5% of Triton X-100, and the resulting suspension was serially diluted and plated onto LB agar (Difco). After an overnight incubation period at 37°C, colony forming units (CFU) were counted. To obtain the percentage of invading bacteria, the ratio between the initial and final

CFU/mL was calculated. Data represent mean values (\pm SEM) from at least three independent biological experiments. Mann Whitney test was performed to evaluate the statistical significance of the observed differences.

2.3 Microscopy experiments

2.3.1 Biofilm formation and confocal laser scanning microscopy observations

Biofilm formation was achieved in a 4-well-chambered cell culture slide (System Nunc™ Lab-Tek™, ThermoFisher Scientific, USA). Briefly, 1 ml of bacterial suspension in PBS were transferred to each well at 10^6 CFU/mL. The slide was incubated at 37°C without shaking in the darkness. After 2 h, PBS was substituted by LB medium, and slide was incubated at 37°C without shaking in the darkness.

At specific incubation times, the medium was removed, and the biofilms were washed twice with PBS. Biofilms were finally stained with Syto9 (ThermoFisher Scientific, USA) for 20 min, following the manufacturer protocol, prior to microscopy experiments. The images were acquired using a Leica TCS SP8 CFS confocal microscope, with fixed stature (Leica Microsystems, Nanterre, France), equipped with a laser diode (Coherent, Les Ulis, France) at 488 nm. Fluorescence emission was detected sequentially by a hybrid detector (Leica Microsystems, Nanterre, France) in photon counting mode with a specific band-pass filter from 500 to 540 nm. Image processing was performed with Imaris software (Bitplane, Switzerland). Data represent mean values (\pm SEM) from at least three independent biological experiments. Mann Whitney test was performed to evaluate the statistical significance of the observed differences.

2.3.2 Measurement of A549 cell density

A549 human lung adenocarcinoma cells (ATCC) were grown as monolayer cultures on 0.8 cm round slides placed in a 24-wells plate, and infected by the *P. aeruginosa* strains, according to the conditions described above (see “Invading capacity experiments”). Before microscopic observations, round slides were washed three times with PBS and stained with DAPI and ActinRed™ 555 ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific, USA) for 20 min. The images were acquired using a Leica TCS SP8 CFS confocal microscope with a x20 objective. DAPI and ActinRed were excited at 405 and 552 nm, respectively. Fluorescence emission was detected sequentially by a hybrid detector in photon counting mode with specific band-pass filters from 500 to 540 nm for DAPI and 570 to 620 nm for ActinRed. Image processing was performed with Imaris software. The cellular density was automatically quantified with the “spot fluorescent detection” option. Data represent mean values (\pm SEM) from at least ten acquisitions, from four independent biological experiments. Mann Whitney test was performed to evaluate the statistical significance of the observed differences.

2.4 Rhamonolipids quantification

2.4.1 Sample preparation

A 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of LB was inoculated with fresh overnight precultures at 10^7 CFU/mL. Cultures were performed at 37°C under shaking at 140 rpm. At specific incubation times, cells were enumerated by conventional dilution series and plating techniques onto LB agar plate to evaluate the number of CFU/mL, and 1 mL of the culture was collected and centrifuged at 9,000 x g for 15 min. The supernatants were filtered with a 0.22 μ m PVDF membrane filter (Millex-GP, Merck Millipore Ltd, Ireland). Filtered supernatants were stored at -20°C until mass spectrometry analyses. Supernatants collection was performed from three independent biological experiments.

2.4.2 LC-MS/MS

The supernatants collected between 2 h and 12 h and at 24 h and 48 h of incubation, were diluted two and ten-fold, respectively. LC-MS/MS analytical conditions were adapted from methods previously described (Bazire et al., 2005; Déziel et al., 2000; Sauvage et al., 2022). Analysis of biosurfactants was performed with a 1290 Infinity II UHPLC system coupled to a 6545XT Advance-Bio Q-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, USA). One μL of diluted supernatant was injected and the separation was carried using a reverse-phase with a Zorbax SB-C18 Rapid Resolution column (4,6 mm x 150 mm, 3.5 μm particle size, 80 Å pore size, Agilent, USA). The mobile phases were water (phase A) and acetonitrile/water (90/10) (phase B) with 4 mM ammonium acetate in each mobile phase. The chromatographic separation was conducted at 50°C with a flow rate of 750 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 20 min by using the following gradient: 3 min at 40% B - 13 min from 40 % to 90% B (linear gradient) - 2 min at 90% B - 12 s from 90 % to 40 % B and 1 min 48 s at 40% B. LC-MS/MS analyses were performed in negative mode on a mass range of 50-1500 m/z . The parameters set for the analysis were 200°C for the gas temperature in source, 3.5 kV and 175 V for the capillary and fragmentary voltage, respectively. The MS2 fragmentation was performed in collision-induced dissociation (CID) mode with a collision energy setting ranging from 5 to 25V, depending on the rhamnolipid congener.

2.5 Biofilm proteomic analyses

2.5.1 Protein extraction

Biofilm formation was achieved in a 4-well-chambered cell culture slide as described above. After 48 h, LB medium was removed, and biofilms were washed twice with PBS. Biofilms were then detached from the slide using a sonication bath with denaturing buffer (7 M urea, 2 M thiourea, tri-N-butylphosphine (TBP) 2 mM, dithiothreitol (DTT) 20 mM, 0.5% (w/v) 3-(4-heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammoniopropanesulfonate (C7BzO), 2% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS)). The bacterial suspension was freeze-thawed for three cycles and then sonicated on ice for 10 min, before the lysate was centrifuged at 12,000 x g for 30 min at 4 °C, to separate cellular debris and soluble proteins. Protein concentrations were evaluated using the Bradford assay (Bio-Rad). Samples were stored in aliquots at -20°C until further use. Protein extraction was performed from three independent biological experiments.

2.5.2 Pre-analytical treatment

For each extract, 25 μg of proteins were mixed with SDS loading buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol (v/v), 0.04% bromophenol blue (w/v), 0.1 M DTT, SDS 4% (w/v)) and loaded onto a 7% polyacrylamide gel (Acrylamide/Bis-Acrylamide 30% [29:1], Sigma-Aldrich). A short period of electrophoresis was performed (90 min at 10-20mA/gel) to concentrate proteins. After migration, gels were stained with Coomassie Blue G250. The revealed protein bands were excised and firstly immersed in reductive buffer (5 mM DTT, Sigma-Aldrich) and then in an alkylated buffer (20 mM iodoacetamide, Sigma-Aldrich). Gel bands were washed with 50% acetonitrile (ACN) (Fisher, Hampton, NH) / 50% ammonium bicarbonate 10 mM (Sigma-Aldrich) and dried 3 times with 100% ACN. Proteins were then digested with 1 μg of trypsin (Promega, Madison, WI), overnight, at 37°C and several steps of peptide extraction were performed. Finally, peptides were dried in a SpeedVac concentrator (ThermoFisher Scientific, USA) at 30°C and stored at -20 °C until mass spectrometry analysis.

2.5.3 NanoLC-MS/MS

Peptides were solubilized in 0.1% formic acid (FA) (v/v) and analysed using mass spectrometry. All the experiments were performed using a Q-Exactive Plus equipment (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) coupled with an Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific). One μL

of sample (0.2 µg) was injected and first eluted toward an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific). The separation was then performed with an analytical column needle (NTCC-360/internal diameter: 100 µm; particle size: 5 µm; length: 153 mm, NikkyoTechnos, Tokyo, Japan). The mobile phases consisted of H₂O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and CH₃CN 80%/H₂O 20% with 0.1% FA (buffer B). The tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 55% of buffer B over 106 min, from 55 to 100% of buffer B over 4 min, and 100% of buffer B for 15 min. The mass spectrometer was operated in the positive ionization mode with the capillary voltage and the source temperature set at 1.8 kV and 275°C, respectively. The samples were analysed using the Higher-Energy Collisional Dissociation (HCD) method. The first scan (MS spectra) was recorded using the Orbitrap analyser (R = 70,000) in the mass range of m/z 400-1800. AGC target and maximum injection time were set to 3.10⁶ and 60 ms, respectively. Then, the 10 most intense ions were selected for tandem mass spectrometry (MS2) experiments, excluding singly charged species. The dynamic exclusion of the already fragmented precursor ions was carried out for 20 s. Fragmentation occurred in the HCD cell analyser at a normalized collision energy of 28. The MS2 spectra were also recorded using the Orbitrap analyser at a lower resolution (R = 17,500).

2.5.4 Protein quantification

After MS analysis, raw data were imported into Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics, version 4.0.4441.29989, Newcastle, UK). For the comparison, one sample was set as a reference, and the retention times of all the other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, a statistical analysis was performed for the one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. For the quantitation, peptide features presenting a p-value and a q-value of less than 0.05 and a power of more than 0.8 were retained. The MS/MS spectra of the selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science, version 2.2.04) against the database of *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 - Assembly GCF_000014625.1 from NCBI. Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage and as variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. The mass tolerances for the precursor and fragment ions were set at 5 ppm and 0.02 Da, respectively. False discovery rates (FDR) were calculated using a decoy-fusion approach. The identified peptide-spectrum-matches (PSM) with a -10logP of 20 or higher were kept at an FDR threshold of 1.5%. The Mascot search results were then imported into Progenesis for further processing. For each condition, the total cumulative abundances of the proteins were calculated by summing the abundances of the corresponding peptides. Proteins identified with less than 2 peptides were discarded and only proteins with a fold change equal to or greater than 1.5 in their average normalized abundances between both strains were retained. The raw files and quantification data were deposited in the ProteomeXchange data repository (accession number PXD044736).

2.6 DNA manipulation

2.6.1 Mutant verification

The good insertion of the transposon MAR2xT7 in *PA14_16140* was controlled by PCR. The primers (**supplementary table S1**) were designed to target the transposon insertion site. For the *PA14_16140* WT gene region, primers amplify from upstream to downstream intergenic region (PCR product: 478 pb). For the mutant, primers were used to amplify the intergenic sequence to the other side of the transposon sequence (PCR product: 1472 pb). PCR was performed from one colony, for 30 cycles of 5 min at 95°C, 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 1 min per Kb at 72°C. The resulting PCR products were loaded onto 1% agarose gel stained with SYBR™ Safe (Invitrogen, ThermoScientific, USA) and visualized using a Chemidoc™ Imaging System (Biorad).

2.6.2 Reverse transcription polymerase chain reaction.

Total RNA was isolated from 1.10^9 bacterial cells with the PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer protocol. To minimize the possibility of DNA contamination, RNA samples were treated with DNase using the TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer protocol. The amount of RNA was quantified by Nanodrop™ (ThermoFisher Scientific, USA). Aliquot of 2 µg of RNA were reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA), according to the manufacturer protocol using random primer as initiation primer in a final reaction volume of 20 µL. Next, retro-transcription reactions were subjected to PCR amplification using specific primers (**supplementary table S1**) targeting the end of the first gene and the beginning of the second gene. The resulting PCR products were loaded onto 1.5% agarose gel stained with SYBR™ Safe (Invitrogen, ThermoScientific, USA) and visualized using a Chemidoc™ Imaging System (Biorad).

2.7 BacA structure determination

2.7.1 BacA production and purification

Briefly, the DNA coding *pa3732* was inserted into pET resulting in a vector called pET-16140. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21 λ(DE3) pLysS and contains a carbenicillin resistance cassette and an IPTG receptor to induce transcription. Cells harbouring the expression vector were positively selected onto Luria-Bertani agar plates containing 100 µg/mL of carbenicillin.

The final product contains a N-terminal 6His tag for the purification by IMAC method. A single clone was picked and inoculated into 2 x 50 mL LB broth (Roth) for overnight growth. A 6x 1L LB culture was inoculated at $OD_{600} = 0.01$ with the overnight culture, and the expression was induced with the addition of 1 mM IPTG when OD_{600} reached 0.6. After 3 h at 37°C, cells were harvested by centrifugation at 5,000 x g for 15 min at 4°C and resuspended in 5 mL of lysis buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl). The bacterial suspension was freeze-thawed for three cycles and then sonicated on ice for 10 min. The lysate was centrifuged at 50,000 x g for 20 min at 4 °C to separate the cellular debris and the soluble proteins. To check the induction, 5 µg of proteins were mixed with sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol (v/v), 0.04% bromophenol blue (w/v), 0.1 M DTT, SDS 4% (w/v)) then loaded onto a 12% SDS–PAGE gels.

The supernatant was applied on an affinity column HisTrap HP™ (GE healthcare) which was pre-equilibrated with the loading buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl). After washing steps with increasing percentages of elution buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 400 mM imidazole), the protein was eluted with 100% of the elution buffer. After sample dialysis and thrombin cleavage to remove the signal peptide, the resistance cassette and the 6His tag, the sample was concentrated on a 10 kDa cut-off Amicon™ (Merck) and loaded on a Superdex™ 75 10/300 (GE healthcare) gel filtration column for further purification. The protein was eluted in one major peak that corresponded to the size of a dimer. The purity of the eluted fractions was verified by SDS-PAGE, and the eluted fractions presenting the highest purity were pooled and concentrated on Amicon™ 10 kDa to a concentration of 20 mg/mL.

A large screening for crystallisation conditions was performed with the kits Crystal Screen™ (Hampton Research), JCSG I™, JCSG II™, JCSG III™ and JCSG IV™ (Molecular Dimensions Limited) by using a nanodrop Mosquito™ (TTP Labtech) automate. Several hits were obtained in different conditions, with size improvement of the crystals when mixing the protein with the terbium complex Tb-Xo4 “crystallophore”, a component developed by E. Girard (IBS, Grenoble) that modifies the solubility of the proteins and can be used for phasing by single-wavelength anomalous dispersion (SAD) (Engilberge et al., 2017). After manual

optimization of several hits, crystals were obtained in 32% PEG 200, 0.2 M NaCl and 0.1 M acetate pH 4.5 with a 1/1 drop to reservoir ratio. Before cryo-cooling they were transferred in the same condition supplemented with 20% (v/v) glycerol.

2.7.2 X-ray data collection and integration

Diffraction data were recorded at the SOLEIL synchrotron (Saclay, France) on PX1 beamline (Coati et al., 2017) with a Eiger-X 16M (Dectris Ltd.), at a wavelength of 1.65Å as to maximize the anomalous signal of Tb. The data sets were indexed and merged with the XDS program (Kabsch, 2010) in the P6(5)22 space group. Data sets were scaled and merged with the POINTLESS/AIMLESS programs (P. Evans, 2006), part of the CCP4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn et al., 2011) and converted to structure factors with the TRUNCATE program (Evans, 2011). The statistics of the best data collection are reported in **supplementary table S2**.

2.7.3 Structure determination and refinement

Refinement of the BacA-Tb-Xo4 structure was performed using the Phenix program (Liebschner et al., 2019). The anomalous differences for the Tb-Xo4 were sufficient to obtain the phases by SAD with Autosol, and the first model was built by the Autobuild procedure (Terwilliger et al., 2008). Standard constraints were used throughout on distances, angles, planes and isotropic factors. The Coot graphic program (Emsley & Cowtan, 2004) was used for rebuilding of the models and water/ligands localization all along the different refinement cycles. All the statistics regarding the final refined structure are also reported in the **supplementary table S2**. The coordinates and structure factors of BacA-Tb-Xo4 were deposited in the PDB (accession number 8Q80). All figures were drawn with PyMOL (Delano W., 2002).

3. Results

3.1 Disruption of *bacA* gene leads to a decrease of rhamnolipids secretion

Rhamnolipids secreted by the WT and the mutant strains were identified and monitored by LC-MS/MS. RHLs were quantified by integrating the extracted-ion chromatogram (EIC) peaks of respective $[M-H]^-$ m/z for each congener from MS spectra (see example **Figure 1A**). Their identifications were confirmed by the MS2 data resulting from the fragmentation of the MS ions with m/z values expected for each glycolipid (see example **Figure 1B**). The relative abundances of RHLs were expressed by calculating the ratio of their respective EIC peak areas to the total EIC peak area for all detected rhamnolipids. For absolute quantification, the respective values of EIC peak areas were reported on a linear calibration curve established with commercial rhamnolipids (R95MD, Sigma-Aldrich) (**Figure 1C**). Finally, to normalize the data with respect to the cellular density in the culture, the quantity of rhamnolipid was related to the number of CFU/mL.

The transposon insertion into the *PAI4_16140* gene did not change the growth ability of the mutant (**supplementary Figures 1A and 1B, respectively**). Whatever the strain, RHLs started to be detected during the log phase (6 h) and their quantity increased with time, reaching a maximum at the end of the stationary phase (48 h). During the stationary phase, the mutation negatively affected the RHL secretion (24 h and 48 h, $p < 0.0001$), (**Figure 1D and supplementary Figure 2A**). Thus, at 24 h and 48 h of culture, the mutant secreted 50% and 63% less rhamnolipids, respectively.

We then monitored the amount of the two mostly abundant rhamnolipids, i.e., the Rha-C₁₀-C₁₀ (noted R1) and the Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (noted R2). At 24 h of incubation, we respectively observed a decrease of 60% ($p < 0.05$) and 40% ($p < 0.05$) of their production in the mutant compared to the WT strain. After 48 h, this behaviour was emphasized with a decrease of 70% ($p = 0.01$) and 56% ($p < 0.05$), respectively (**supplementary Figure 2D**).

3.2 The *bacA* mutant is impaired in swarming motility

The swarming motility is an important group behaviour, essential to promote biofilm formation by *P. aeruginosa*. Moreover, RHLs, as surface-active molecules, act as wetting agents during the swarming motility (Caiazza et al., 2005). Consequently, the swarming motility of the *bacA* mutant was compared to that of the WT strain. As shown in **figures 2A and 2B**, swarming motility was significantly reduced in the mutant compared with the WT ($p < 0.01$). Furthermore, the classical profile of *P. aeruginosa* expansion on the Petri dish appeared massive for the mutant. The shape of the dendritic ends was highly disordered, an observation that could be correlated with a lack of wetting agents such as rhamnolipids (Kearns, 2010).

3.3 Mutation of *bacA* affects biofilm formation

Considering the role of RHLs and swarming motility during the biofilm formation, the ability of the mutant to form biofilms was investigated. At specific incubation times, slides were picked up, stained with Syto 9 and observed by CLSM. Results showed no differences between the WT and the mutant after 2 h and 4 h of incubation (**Figure 2C**), times corresponding to the initial adhesion step and to the beginning of microcolony formation, respectively. In contrast, at 24 h and 48 h (maturation and dispersion steps), the mutation negatively affected the biomass amount which decreased by 28% ($p < 0.05$) and 86% ($p < 0.0001$), respectively (**Figures 2C and 2D**).

3.4 The *bacA* mutant exhibits limited invading capacity and cytotoxicity

Bacterial adherence to eukaryotic cells is crucial to induce a chronic infection since it is the first step of the biofilm formation. We thus investigated the ability of the two strains to adhere onto A549 cells. As shown on **figure 2E and supplementary Figure 3**, the cell layer appeared more degraded in contact with the WT in comparison with the mutant which exhibited an invading ability of 55% ($p < 0.01$) (**Figure 2F**).

3.5 The *bacA* mutant proteome revealed accumulation of the BAC cognate partners

To help deciphering the functional role of BacA, we compared the proteome of sessile *bacA* mutant cells to that of the WT. More than 1700 proteins were identified, among which, 205 showed a significant variation of abundance (fold > 1.5 and $p < 0.05$): 38 proteins were accumulated and 167 proteins down-regulated in the mutant (**Figure 3A and supplementary table S3**).

Based on PseudoCAP functional classes and KEGG pathways, proteins presenting decreased abundance were involved in different processes, including bacterial fitness, transport, fatty acid metabolism and energetic metabolism (**Figure 3B**). Concerning accumulated proteins, a strong enrichment of proteins involved in adaptation and protection was observed (**Figure 3B**).

To identify functional connections between the proteins differentially produced, we used this subset of proteins to construct a protein-protein interaction network. The latter was first constructed using the String database, by selecting connections over a threshold of 0.6 of confidence. The resulting network was visualized within Cytoscape (version 3.10.0) (**Figure 3C**). We observed a high number of interactions between down-regulated proteins, involved in the superpathways of glycolysis, pyruvate metabolism, tricarboxylic acid cycle (TCA) and oxidative phosphorylation. Within this profile, we also noted a reduced abundance of proteins associated with transport step of the spermidine biosynthesis or the catabolic putrescine aminotransferase, virulence, matrix synthesis and prominently oxidative stress response (**Figure 3C and supplementary table S3**).

On the other hand, the proteome of the mutant pointed out an accumulation of a few tens of proteins. Interestingly, among the proteins which exhibited by far the highest folds, 5 caught our attention: (i) BAC proteins, *i.e.*, PA14_16150 (BacB), 7.2-fold; PA14_16160 (BacC), 7.9-fold; PA14_16180 (BacD), 13.5-fold and (ii) two additional proteins: PA14_16190, 8.9-fold

and PA14_16200, 6.1-fold, both encoded by genes which are immediately downstream the *bac* system.

Based on these observations, we hypothesized that the *bac* system is composed of 6 genes and not 4, and secondly, given their increased abundance in the $\Delta bacA$ strain, the BAC system would be regulated by BacA.

3.6 Organisation and regulation of the *bac* system

To verify our first hypothesis, we analysed the transcription of genes from PA14_16140 (*bacA*) to PA14_16200 in the WT. According to the **figure 4A**, a specific amplification product was detected at each intergenic region separating *bacA*, *bacB*, *bacC*, *bacD*, PA14_16190 and PA14_16200. In conclusion, the BAC system is coding by 6 genes organized in operon, including two newly discovered members PA14_16190 and PA14_16200, renamed *bacE* and *bacF*, respectively.

By sequence analysis, we also identified at the position -12 and -24 *bacA* promoter, a σ^{54} -binding site (**Figure 4B**).

3.7 BacA is homologous to type-III secretion chaperones and to regulatory proteins

To verify our second hypothesis, we performed bioinformatic investigations. The protein domains are presented in **figure 5A**. The domain search performed with Interpro database (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) revealed that BacA is identified as a DUF 2170-containing domain protein (Pfam PF09938) and belongs to the Yjfl family. The protein Yjfl of *E. coli*, of unknown function, contains a DUF2170 domain and also a CesT/Tir-like domain. In *E. coli*, CesT is a protein chaperone of the type-III secretion system (T3SS) secreted protein Tir (Elliott et al., 1999).

We then performed a search for proteins structurally homologous to BacA using the I-TASSER server (J. Yang & Zhang, 2015). The top 10 proteins are listed in the **supplementary table S4** and their three-dimensional structure given in **supplementary figure 4A**. Here again, BacA appeared structurally similar to numerous T3SS chaperones/regulatory proteins. Despite a low sequence homology, these proteins share a common fold that is characterized by the same α - β - β - α - β - β - α topology. Among them, some are T3SS chaperones like SicP (1jyo) from *Salmonella enterica* which possesses the best TM-score (0.792), while others are regulators of gene expression, as YbjN (6vu7) from *E. coli* (TM-score of 0.732). The third protein in the list, named ExsC (3kxy), is both a T3SS chaperone and a transcription regulator (TM-score of 0.723) in *P. aeruginosa*.

However, a Blast of the BacA sequence, directly targeting the protein data bank (PDB: <https://www.rcsb.org/>), gave no result. This led us to solve the structure by crystallography. It was solved by using a caged terbium called Xo4 for experimental phasing, in space group P6₅22 with two monomers in the asymmetric unit, in accordance with the size exclusion chromatography result. Nevertheless, the functional dimer conventionally described for the type III secretion system chaperone family does not correspond to this « asymmetric unit dimer » but is reconstituted by symmetry related molecules, issuing with two dimers each one being formed by crystallographic second order axis. The Tb-Xo4 molecule is localized at the interface of the two monomers present in the asymmetric unit, participating in the stabilization of the crystal packing, trapped by the N-terminus and Trp-39 of monomer A, by Glu-112 of monomer B interacting with the atom of terbium, and by Arg-136 of a symmetry-related monomer B (**supplementary Figure 4B**).

The 3D structures of the two monomers are very similar, with a two-layers alpha + beta mixed domain, and adopt the α - β - β - α - β - β - α topology characteristic of the type-III secretion system chaperone family, with an average root-mean-square deviation (Rmsd) of 0.6 Å on C α for the 115 closest residues over the 139 amino-acids that have been crystallized. All the variability is

localized at the N- and C-terminus and in the three loops linking the beta strands on the surface of the protein at the opposite side of the 3 alpha helices. Only 8 residues for each monomer, 3 at the N-terminus, 2 at the C-terminus and 3 in the loop 130-136 have not been constructed due to the absence of electron density. Two residues present alternative positions, Glu-90 in monomer A (A-Glu-90) and His-155 in monomer B (B-His-155), these residues being localized at the biological dimer interface, in close proximity. In addition to the protein amino-acids, 29 water molecules have been added, which correspond to the expected number for this resolution, six of them being localized at the dimer's interfaces. One molecule of glycerol has been trapped in monomer A in the concave surface of the twisted six-stranded anti-parallel β -sheet in a pocket formed by the side chains of 4 residues (Tyr-72, Phe-84, Glu-95, Leu97). The density present at the equivalent position in the second monomer is not clear enough to position a second glycerol molecule. The location where is found this glycerol in molecule A corresponds to the region of interaction between the chaperone and the effector in the structure solved of the complex formed between the multi-cargo chaperone CesT and the translocated intimin receptor (Tir) from the enteropathogenic *E. coli* (Little & Coombes, 2018), Tir being the first translocated effector in the infected host cell via the type-III secretion system (T3SS) (**Figures 5B and 5C**). Even if the different members of the type-III secretion chaperone family all adopt a similar 3D organization with 3 helices laying on a 5 to 6 strands β -sheet, it is very hard to superpose their respective structures, due to a very high flexibility of the structure render by the curvature of the β -sheet and the presence of the long loops between the different strands. This is especially true considering the respective orientation of the two molecules forming the functional dimer, even if the structure of BacA presents a high similitude with the one of ExsC, the protein from *P. aeruginosa* that presents both a chaperone and a transcription regulator function (**Figure 5C**).

4. Discussion

In the microbial world, biofilm formation is a widespread process during which bacteria move from a planktonic to an adherent state. Sessile bacteria then become particularly resistant to antimicrobials which causes major problems in public health (Wallart et al., 2023).

It is also well known that *P. aeruginosa* uses multiple appendages to explore and colonise its environment. This motility is a key feature during the bacterial infection. While flagellum-mediated swimming is adapted for movement in a liquid medium, coordinated multicellular migration, called swarming, is better suited for surface exploration. Surface properties such as hydrophobicity and charge have a significant influence on the bacterial adhesion. To compensate a lack of substratum attractiveness, *P. aeruginosa* can secrete biosurfactants among which rhamnolipids (Banat et al., 2000; Lang, 2002; Raza et al., 2010; Ron & Rosenberg, 2001; Szymanska & Sadowski, 2010; L. Wu et al., 2019). The secretion of rhamnolipids is crucial to lower the surface tension, facilitating the migration of bacteria on the semi-solid surface as defined groups called tendrils (Kohler et al., 2000). The tendril movement is controlled by two molecules with opposite action: the di-rhamnolipids attract cells while the rhamnolipids precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) repel them.

Here, the most abundant di-rhamnolipid Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ was much less secreted by the *bacA* mutant and this observation correlates with the reduced swarming migration observed. In addition, the appearance of the tendrils, which are irregularly shaped and slightly separated, suggests that the mutant secretes less HAAs. Since HAAs are the precursor of rhamnolipids, this hypothesis could also explain the decrease in the secretion of mono- and di-rhamnolipids in the mutant. Indeed, the two rhamnosyltransferases RhlB and RhlC convert respectively HAAs into mono-rhamnolipids and mono-rhamnolipids into di-rhamnolipids by the addition of a dTDP-L-rhamnose (Ochsner et al., 1994; Rahim et al., 2001).

Beside their implication in swarming, rhamnolipids are known to be important determinants of biofilm formation, according to their localisation and concentration within biofilms. Whereas lower concentrations promote cell aggregation and formation of microcolonies during starvation (Herman et al., 1997; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007), high concentrations and swarming allow colonies to detach from mature biofilms to more favourable environments (Patriquin et al., 2008). In mature biofilms, to ensure transport of water and nutrients through channels, rhamnolipids prevent their colonisation by inhibiting cell-cell interactions (Davey et al., 2003). The *bacA* mutant was severely impaired in its ability to form a biofilm. Although this biofilm-defective phenotype can be clearly linked to its deficiency in rhamnolipid production and so swarming motility, it remains difficult to understand the underlying mechanisms.

To go further in this understanding, we analysed the proteomes of the WT and the *bacA* mutant grown in the biofilm mode. The translocation of the EPS Pel across the membrane and the biosynthetic step of alginate was harshly impacted in the mutant, suggesting that rhamnolipids were not the unique component depleted in its matrix. Considering the role of Pel in microcolonies formation and biofilm stability (Jennings et al., 2015) and that of alginate in protection (Pulcrano et al., 2012), we can suppose that biofilms formed by the mutant are more unstable.

Interestingly, we observed a reduced abundance of the transcriptional regulator Vfr in the mutant, Vfr being able to activate LasR expression (Albus et al., 1997). The quorum sensing (QS) system Las, closely linked to the second QS system, Rhl, regulates several genes in a cell density dependent manner such as virulence factor production, biofilm maturation, rhamnolipid production and motility phenotypes. The QS system Rhl activates the expression of LecA and LecB, two lectins involved in adhesion to eukaryotic cells. In addition, the post-transcriptional regulator DksA, which was also less abundant in the mutant, is required for full translation of the *lasB* and *rhlAB* genes (Jude et al., 2003). These observations explain the decrease of motility, virulence and biofilm formation ability in the mutant.

In addition, *P. aeruginosa* biofilms are constantly faced with reactive oxygen species (ROS) including the superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), and the oxidizing hydroxyl radical ($OH\cdot$). They are endogenously generated by the reduction of oxygen in aerobic metabolism of bacterial cells (Seaver & Imlay, 2004) or released by the immune system cells during infection as a first line of defence (Sies et al., 2022). Among its broad arsenal, *P. aeruginosa* possesses several enzymes to detoxify oxidative agents. The *bacA* mutant exhibits a clear oxidative stress response failure as revealed by the decrease in a large proportion of detoxifying enzyme such as the two superoxide dismutases SodB and SodM that catalyse the conversion of O_2^- into H_2O_2 and three peroxidases that reduce H_2O_2 into H_2O . To detoxify oxidative agents, all these enzymes utilize an immediate electron donor to the reduction reaction. Interestingly, we identified here, in the mutant, a lower abundance of peroxidase electron donor azurin Azu (Ronnberg et al., 1981; H.-J. Wu et al., 2005) and thiol peroxidase electron donor thioredoxine TrxA (Jeong et al., 2000). In *P. aeruginosa*, genes involved in the oxidative stress responses are tightly regulated by several transcriptional regulators. In the *bacA* mutant, the expression level of the ferric uptake regulator Fur which positively regulates the expression of *sodB* gene was reduced. All these observations suggest that the *bacA* mutant may be more susceptible to oxidative agents leading to potential damage to proteins and lipids and emergence of mutations. Only the putative catalase KatE (also named KatC) appeared accumulated in the mutant, but its functional role remains unclear. Indeed, in PA14, KatE was not shown to be involved in the H_2O_2 detoxification (Lee et al., 2005) while it appeared to protect the PAO6049 strain in a temperature dependant manner (Mossialos et al., 2006).

In addition, a structural homology search with i-TASSER showed conserved domain architecture for BacA, similar to T3SS chaperones and members of the YbjN superfamily (*E. amylovora* AmyR, *D. radiodurans* DR1245, *E. coli* YbjN and *S. elongates* T110839) by sharing a common α - β - β - β - α - β - β - α topology. However, despite this structural homology with T3SS chaperones, *bacA* occupies distinct genomic location from that known for T3SS clusters. In *P. aeruginosa*, the genes for T3SS chaperones are organized in operon or located adjacent to the genes of the type III effector. This genomic organisation does not apply to BacA, supporting the hypothesis that BacA doesn't perform a T3SS role. Similar cases were already reported in the literature, such as for AmyR, DR1245, YbjN and T110839. The latter, although exhibiting structural homologies with T3SS chaperones, are not involved in T3SS functioning, but rather in the regulation of the stress-response (Bore et al., 2007; Byrne et al., 2014; Hayashi et al., 2003; Keeney et al., 2008; Norais et al., 2013; Piqué et al., 2015; Wang et al., 2011).

From our study, the BAC system is formed by the 6 genes *bacABCDEF* operon. According to protein domain analysis, BacA belongs to the DUF2170-containing Yjfi family. In *E. coli*, the gene *yjfi* is part of the *yjfiJ* operon where Yjfi has no attributed function and YjfiJ is a PspA homolog (Pederick et al., 2023). In our case the gene product located downstream is BacB, annotated as a putative phage shock protein (Psp) on UniprotKB and displaying moderate sequence identity to PspA (around 30%).

In *E. coli*, the phage shock protein stress response system is responsible for repairing damage to the inner membrane and also for the maintenance of the proton-motive force across the inner membrane. In this bacterium, the Psp system involved seven proteins: the *psp* operon containing the genes coding for PspA, PspB, PspC, PspD and PspE; and the single genes coding for PspF and PspG (Model et al., 1997). Here, however, no homology was found between BAC proteins and proteins of the *E. coli* Psp system.

Recently, evolution and genomic contexts of PspA across the bacterial clade were characterised using a large-scale bioinformatic approach (Ravi et al., 2020). This study revealed that PspA is well conserved across the bacterial clade, but not its cognate partners. Thus, variable genomic contexts surround PspA. However, despite various environments, conservation of a Psp system across the bacterial phyla highlights the importance of this stress response in prokaryotes. Thus, many Psp systems have been discovered in other bacteria as the *sco2167-69* operon in *Streptomyces lividans* (Vrancken et al., 2008), the *pspA-ydj* operon and the *liaIHGF'SR* in *Bacillus subtilis* (Z. Yang et al., 2021) and the *clgRpspAMN* operon in *Mycobacterium tuberculosis* (Datta et al., 2015). In these cases, PspA always preserves the cell membrane, and its cognate partners help PspA to achieve this protective role.

Two genomic contexts, already described, are consistent with the present results. *Dokdonia donghaensis*, contains an operon of 6 genes, including a DUF-2170 containing protein in first position and a gene coding a PspA homolog just downstream. Unfortunately, no experimental data is yet available for this operon. In *Shewanella oneidensis* a DUF-2170 containing protein and a PspA homolog are associated with a membrane-associated spermidine synthase. However, no protein in or around the BAC system exhibits a sequence homology with a spermidine synthase. Moreover, spermidine synthesis is well documented in *P. aeruginosa* and genes involved in this pathway identified (Lu et al., 2002; Nakada & Itoh, 2003). To our knowledge, the occurrence of a DUF-2170 containing protein and PspA in an operon has never been reported in *P. aeruginosa*. This study thus demonstrates that *P. aeruginosa* contains an original Psp system. Further genomic and functional comparative analyses between these operons would be necessary to elucidate the precise role of all the BAC proteins.

Also, important to note that some T3SS chaperones possess transcriptional regulation activity in addition to the one of chaperoning. Transcriptional regulation by T3SS chaperones may occur through direct interaction with a transcriptional regulator or through indirect interaction with a transcriptional regulator via a co-activator and an antiactivator (Spa15 of *S. flexneri* which acts as a co-antiactivator to sequester the transcriptional activator MxiE (Parsot et al., 2005)), or to sequester an inhibitor of a transcriptional regulator. In *P. aeruginosa*, the T3SS transcriptional regulation involved a ‘catch and release’ mechanism. This regulatory cascade implies three interacting proteins (ExsD, ExsC, and ExsE): *i*) ExsD, an anti-activator, binds to and inhibits ExsA-dependent transcription, *ii*) ExsC, an anti-anti-activator, binds to and inhibits ExsD and *iii*) ExsE, an inhibitor of ExsC and is secreted by the T3SS. Under Ca^{2+} replete conditions, ExsE is retained in the cytoplasm and forms a complex with ExsC. The sequestration of ExsC by ExsE allows for the binding of the anti-activator ExsD to ExsA, thereby blocking transcription. Under conditions promoting induction, as Ca^{2+} depletion, ExsE is secreted into the extracellular environment. The corresponding decrease in the intracellular ExsE concentration releases ExsC, which then sequesters ExsD and thereby makes ExsA available to activate transcription of T3SS genes (Hauser, 2009).

The shared fold between BacA and T3SS chaperones suggests a conserved mechanism. The proteomic analysis showed that accumulation of BAC cognate partners is a consequence of the absence of BacA. Thus, we suggest that BacA will most likely be part of a regulatory pathway conducting through specific protein-protein interactions, to sequester a transcriptional regulator, necessary for the transcription of the *bac* operon. A major distinction among the Psp system concerns the regulation following the stress perception. In enterobacteria, transcription of the *psp* operon is induced by the PspF coding by the *pspF* independent gene. In the absence of stress, PspA binds PspF and prevents the transcriptional activation of the *psp* operon. During stress, the two membrane proteins PspB and PspC recruit PspA, and consequently, the released PspF activates the transcription of the *psp* operon. The regulation of the Psp systems of *B. subtilis* and *M. tuberculosis* is divergent from the historical *E. coli* Psp system (both reviewed in Manganelli & Gennaro, 2017). In the same way for the BAC system, we cannot exclude the intervention of other proteins, in particular the BAC cognate partners, in this regulatory pathway.

This hypothesis is supported by the BacA dimer interactions detected in the crystal packing which are reminiscent of the way that T3SS chaperones interact with their respective targets. Moreover, the String protein-protein network suggests interactions between all the BAC proteins, that were confirmed by additional works showing a strong interaction between BacA and BacB (unpublished results; Ben Mlouka, 2014). A thorough experimental analysis of the regulatory interaction of BacA with its cognate partners would be necessary to understand the system functioning. Moreover, a putative chaperone activity of BacA has to be investigated, in particular to find other targets, in the aim, to explain, among others, the altered abundance of some proteins in the *bacA* mutant.

5. Conclusion

We show here that the BAC system is coded by 6 genes (*bacA* to *bacF*) organized in operon that BacA seems to regulate at a post-transcriptional level. As for *E. coli psp* regulon, the *bacABCDEF* operon transcription appears dependent on the σ^{54} sigma factor. However, the *P. aeruginosa* BacB genomic context is highly different to that of PspA in *E. coli*. From our results, the BAC system is clearly involved in different mechanisms linked to *P. aeruginosa*

pathogenicity, in particular in virulence and biofilm formation. It is expected that these data will pave the route to numerous works aiming at an in-depth characterization of the contribution of the different actors of this system.

6. Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repositories and accession number(s) can be found in the “Materials and Methods” section.

7. Conflict of interest

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.

8. Author Contributions

Conceived and designed experiments: LC, MA-BM, LW, HL, JH, IB, PC, EG, GP

Performed the experiments: LC, MA, BM, LW, JH, BS, MC-KM, IB, EG, GP

Analysed the data: LC, MA, BM, LW, HL, IB, GP

Wrote the paper: LW, MA-BM, LC, HL, TJ, IS, PC, IB

All authors read and approved the final manuscript.

9. Funding

This work is supported by Rouen Normandy University and Normandy region. Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund. We also thank the Rouen Normandy University for the PhD funding of LW.

10. Acknowledgements

We want to thank PRIMACEN for confocal microscopy studies. We are grateful to V. Molle from the INSERM U1047 for the *E. coli* strain construction. We also thank C. Garnier (AI paid by an ANR grant MISTEC-17-CE11-0028-02), J. Fonta (engineer ESCOM during her technical internship), and M. Lustig (PhD) for their technical support. We acknowledge SOLEIL for the use of their synchrotron radiation facilities and thank the staff at the PX1 beamline for help and advices. We thank the Polyvalan company (<https://crystallophore.fr/>, Lyon) for providing us with the TbXo4 molecule and E. Girard for advices for its use.

11. Supplementary material

The supplementary Material for this article can be found online.

12. References

- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E., & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(12), 3928–3935. <https://doi.org/10.1128/jb.179.12.3928-3935.1997>
- Azzopardi, E. A., Azzopardi, E., Camilleri, L., Villapalos, J., Boyce, D. E., Dziewulski, P., Dickson, W. A., & Whitaker, I. S. (2014). *Gram Negative Wound Infection in Hospitalised Adult Burn Patients-Systematic Review and Metanalysis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095042>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.029>
- Ben Mlouka, M. A. (2014). *Caractérisation du système BAC impliqué dans la formation de biofilms chez Pseudomonas aeruginosa* [These de doctorat, Rouen]. <https://www.theses.fr/2014ROUES051>
- Bore, E., Hébraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjæret, C., Moen, B., Møretro, T., Langsrud, Ø., Rudi, K., & Langsrud, S. (2007). Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 935–946. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29288-0>
- Byrne, R. T., Chen, S. H., Wood, E. A., Cabot, E. L., & Cox, M. M. (2014). *Escherichia coli* Genes and Pathways Involved in Surviving Extreme Exposure to Ionizing Radiation. *Journal of Bacteriology*, 196(20), 3534–3545. <https://doi.org/10.1128/jb.01589-14>
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., & O’Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7351–7361. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005/FORMAT/EPUB>
- Coati, A., Chavas, L. M. G., Fontaine, P., Foos, N., Guimaraes, B., Gourhant, P., Legrand, P., Itie, J.-P., Fertey, P., Shepard, W., Isabet, T., Sirigu, S., Solari, P.-L., Thiaudiere, D., & Thompson, A. (2017). Status of the crystallography beamlines at synchrotron SOLEIL*. *The European Physical Journal Plus*, 132(4), 174. <https://doi.org/10.1140/epjp/i2017-11403-3>
- Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, E. C., Kempell, K. E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J. E., Davies, D. E., & Cappello, F. (2016). *Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438>
- Datta, P., Ravi, J., Guerrini, V., Chauhan, R., Neiditch, M. B., Shell, S. S., Fortune, S. M., Hancioglu, B., Igoshin, O. A., & Gennaro, M. L. (2015). The Psp system of *Mycobacterium tuberculosis* integrates envelope stress-sensing and envelope-preserving functions. *Molecular Microbiology*, 97(3), 408–422. <https://doi.org/10.1111/mmi.13037>

Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1027–1036. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003>

Delano W., D. W. (2002). The PyMOL molecular graphics system. <Http://Www.Pymol.Org/>. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570572701247244160>

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., & Villemur, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1485(2–3), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00039-1)

Elliott, S. J., Hutcheson, S. W., Dubois, M. S., Mellies, J. L., Wainwright, L. A., Batchelor, M., Frankel, G., Knutton, S., & Kaper, J. B. (1999). Identification of *CesT*, a chaperone for the type III secretion of *Tir* in enteropathogenic *Escherichia coli*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01559.x>

Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12), Article ARRAY(0xab2a914). <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>

Engilberge, S., Riobé, F., Pietro, S. D., Lassalle, L., Coquelle, N., Arnaud, C.-A., Pitrat, D., Mulatier, J.-C., Madern, D., Breyton, C., Maury, O., & Girard, E. (2017). Crystallophore: A versatile lanthanide complex for protein crystallography combining nucleating effects, phasing properties, and luminescence. *Chemical Science*, 8(9), 5909–5917. <https://doi.org/10.1039/C7SC00758B>

Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(1), Article 1. <https://doi.org/10.1107/S0907444905036693>

Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), Article 4. <https://doi.org/10.1107/S090744491003982X>

Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Hoiby, N., & Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: An evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 841–851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2907>

Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014). Plate-Based assay for swimming motility in *pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 59–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7

Hausser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>

Hayashi, S., Aono, R., Hanai, T., Mori, H., Kobayashi, T., & Honda, H. (2003). Analysis of organic solvent tolerance in *Escherichia coli* using gene expression profiles from DNA microarrays. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(4), 379–383. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)80071-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(03)80071-3)

He, J., Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M., & Rahme, L. G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence

- genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2530–2535. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0304622101>
- Herman, D. C., Zhang, Y., & Miller, R. M. (1997). Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3622–3627.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., & Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 55–65. <https://doi.org/10.4248/IJOS11026>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11353–11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jeong, W., Cha, M.-K., & Kim, I.-H. (2000). Thioredoxin-dependent Hydroperoxide Peroxidase Activity of Bacterioferritin Comigratory Protein (BCP) as a New Member of the Thiol-specific Antioxidant Protein (TSA)/Alkyl Hydroperoxide Peroxidase C (AhpC) Family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2924–2930. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2924>
- Jude, F., Köhler, T., Branny, P., Perron, K., Mayer, M. P., Comte, R., & van Delden, C. (2003). Posttranscriptional Control of Quorum-Sensing-Dependent Virulence Genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3558–3566. <https://doi.org/10.1128/jb.185.12.3558-3566.2003>
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), Article 2. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Keeney, D., Ruzin, A., McAleese, F., Murphy, E., & Bradford, P. A. (2008). MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 46–53. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm397>
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000/FORMAT/EPUB>
- Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1), 12–20. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00007-9)
- Lee, J.-S., Heo, Y.-J., Lee, J. K., & Cho, Y.-H. (2005). KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infection and Immunity*, 73(7), 4399–4403. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4399-4403.2005>
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., & Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2833–2838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511100103>

- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L.-W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Sammito, M. D., Sobolev, O. V., ... Adams, P. D. (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(10), Article 10. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>
- Little, D. J., & Coombes, B. K. (2018). Molecular basis for CesT recognition of type III secretion effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, 14(8), e1007224. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007224>
- Lu, C.-D., Itoh, Y., Nakada, Y., & Jiang, Y. (2002). Functional Analysis and Regulation of the Divergent spuABCDEFGH-spuI Operons for Polyamine Uptake and Utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3765–3773. <https://doi.org/10.1128/jb.184.14.3765-3773.2002>
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G.-A., & Jouenne, T. (2008). Identification of Biofilm-Associated Cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Biofilm Formation and Virulence. *PLoS ONE*, 3(12), e3897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003897>
- Manganelli, R., & Gennaro, M. L. (2017). Protecting from Envelope Stress: Variations on the Phage-Shock-Protein Theme. *Trends in Microbiology*, 25(3), 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.10.001>
- Mikkelsen, H., McMullan, R., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in ladS. *PLoS ONE*, 6(12), e29113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029113>
- Model, P., Jovanovic, G., & Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Molecular Microbiology*, 24(2), 255–261. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.3481712.X>
- Mossialos, D., Tavankar, G. R., Zlosnik, J. E. A., & Williams, H. D. (2006). Defects in a quinol oxidase lead to loss of KatC catalase activity in *Pseudomonas aeruginosa*: KatC activity is temperature dependent and it requires an intact disulphide bond formation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.225>
- Murphy, T. F. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 15(2), 138–142. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328321861a>
- Nakada, Y., & Itoh, Y. (2003). Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology*, 149(3), 707–714. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26009-0>
- Norais, C., Servant, P., Bouthier-de-la-Tour, C., Coureux, P.-D., Ithurbide, S., Vannier, F., Guerin, P. P., Dulberger, C. L., Satyshur, K. A., Keck, J. L., Armengaud, J., Cox, M. M., & Sommer, S. (2013). The *Deinococcus radiodurans* DR1245 Protein, a DdrB Partner Homologous to YbjN Proteins and Reminiscent of Type III Secretion System Chaperones. *PLOS ONE*, 8(2), e56558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056558>

- Ochsner, U. A., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19787–19795. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32089-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32089-6)
- O’Connell, H. A., Kottkamp, G. S., Eppelbaum, J. L., Stubblefield, B. A., Gilbert, S. E., & Gilbert, E. S. (2006). Influences of Biofilm Structure and Antibiotic Resistance Mechanisms on Indirect Pathogenicity in a Model Polymicrobial Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5013–5019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-05>
- Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2531–2539. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-06>
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d’Hauteville, H., Sansonetti, P., & Demers, B. (2005). A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 56(6), 1627–1635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04645.x>
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., & Poole, K. (2008). Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 662–671. <https://doi.org/10.1128/JB.01473-07>
- Pederick, J. L., Klose, J., Jovcevski, B., Pukala, T. L., & Bruning, J. B. (2023). *Escherichia coli* YgiC and Yjfc Possess Peptide–Spermidine Ligase Activity. *Biochemistry*, 62(4), 899–911. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00592>
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., & Tomás, J. M. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Project, C. C., & Number 4. (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50(5), Article 5. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
- Pulcrano, G., Iula, D. V., Raia, V., Rossano, F., & Catania, M. R. (2012). Different mutations in mucA gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on algU gene expression. *NEW MICROBIOLOGICA*, 35, 295–305.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40(3), 708–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>
- Ravi, J., Anantharaman, V., Chen, S. Z., Datta, P., Aravind, L., & Gennaro, M. L. (2020). *Phage-shock-protein (Psp) Envelope Stress Response: Evolutionary History & Discovery of Novel Players*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.301986>
- Raza, Z. A., Khalid, Z. M., Khan, M. S., Banat, I. M., Rehman, A., Naeem, A., & Saddique, M. T. (2010). Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. *Biotechnology Letters*, 32(6), 811–816. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0216-x>

- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229–236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
- Ronnberg, M., Araiso, T., Ellfolk, N., & Dunford, H. B. (1981). The reaction between reduced azurin and oxidized cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 256(5), 2471–2474. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69805-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69805-4)
- Sauvage, S., Gaviard, C., Tahrioui, A., Coquet, L., Le, H., Alexandre, S., Ben Abdelkrim, A., Bouffartigues, E., Lesouhaitier, O., Chevalier, S., Jouenne, T., & Hardouin, J. (2022). Impact of Carbon Source Supplementations on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology. *Journal of Proteome Research*, 21(6), 1392–1407. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00936>
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2004). Are Respiratory Enzymes the Primary Sources of Intracellular Hydrogen Peroxide? *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48742–48750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408754200>
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Szymanska, A., & Sadowski, Z. (2010). Effects of biosurfactants on surface properties of hematite. *Adsorption*, 16(4), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10450-010-9251-0>
- Terwilliger, T. C., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Zwart, P. H., Hung, L.-W., Read, R. J., & Adams, P. D. (2008). Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 64(1), Article 1. <https://doi.org/10.1107/S090744490705024X>
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., & Jouenne, T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: A multivariate statistical approach. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.014>
- Vrancken, K., Van Mellaert, L., & Anné, J. (2008). Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3475–3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01966-07>
- Wallart, L., Dé, E., Hardouin, J., Cosette, P., & Jouenne, T. (2023). The Biofilm Resistance: Many Responses but Still Many Questions. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 51(4), 42895–42900. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2023.51.008133>
- Wang, D., Calla, B., Vimolmangkang, S., Wu, X., Korban, S. S., Huber, S. C., Clough, S. J., & Zhao, Y. (2011). The orphan gene ybjN conveys pleiotropic effects on multicellular behavior and survival of *Escherichia coli*. *PloS One*, 6(9), e25293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025293>
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), Article 4. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wu, H.-J., Seib, K. L., Edwards, J. L., Apicella, M. A., McEwan, A. G., & Jennings, M. P. (2005). Azurin of Pathogenic *Neisseria* spp. Is Involved in Defense against Hydrogen Peroxide

and Survival within Cervical Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 73(12), 8444–8448. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8444-8448.2005>

Wu, L., Lai, L., Lu, Q., Mei, P., Wang, Y., Cheng, L., & Liu, Y. (2019). Comparative studies on the surface/interface properties and aggregation behavior of mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.012>

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Web Server Issue Published Online*, 43. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>

Yang, Z., Schneider, D., Brüser, T., Bramkamp, M., Savietto Scholz, A., Baur, S. S. M., & Wolf, D. (2021). An Stomatin, Prohibitin, Flotillin, and HflK/C-Domain Protein Required to Link the Phage-Shock Protein to the Membrane in *Bacillus subtilis*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754924>

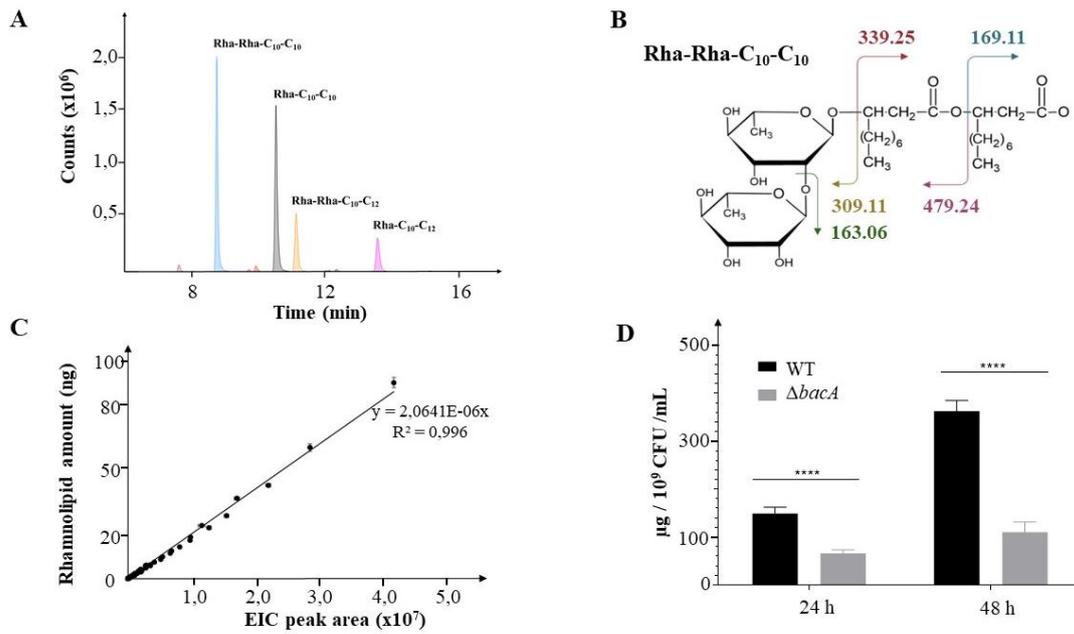


Figure 1. Decrease of rhamnolipid secretion.

(A) Extracted Ion Chromatogram (EIC) peaks detected for the most abundant rhamnolipids collected from bacterial cultures. (B) Molecular representation of the expected fragmentation pattern of the Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z 649.38). (C) Calibration curve obtained from commercial rhamnolipids. The EIC areas were measured from MS data for all detected rhamnolipids injected at concentrations covering nearly 2 orders of magnitude (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 ng). (D) Rhamnolipid quantification in supernatants of 24 h or 48 h culture of the WT strain and the *bacA* mutant. Data are expressed as mean values (\pm SEM) from three independent biological experiments (**** $p < 0.0001$, 2way ANOVA).

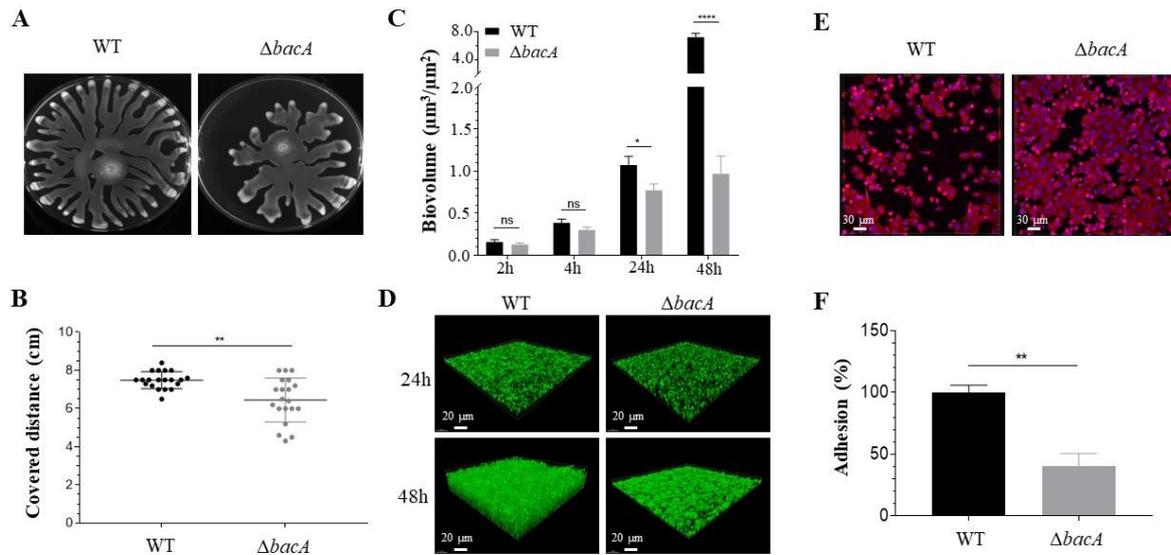


Figure 2. Differential phenotypic traits.

(A) Swarming motility assay in agar plates after 16 h of incubation at 37°C. (B) Resulting covered distances for the WT and $\Delta bacA$ (** $p < 0.01$). (C) Quantitative comparison of biofilm biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) based on the integration of microscopy images. Data represent mean values (\pm SEM) from at least three independent biological experiments (ns: non-significant; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$). (D) Representative confocal microscopy images of *P. aeruginosa* WT and $\Delta bacA$ biofilms labeled with Syto9. (E) Representative CLSM images of A549 cell layers after 2 h of incubation with the WT or the mutant. The nucleus (in blue) and actin (in pink) were labeled with DAPI and phalloidin rhodamine, respectively. (F) Percentage of adhesion after 2 h of contact with the WT and the mutant. Data represent mean values (\pm SEM) from at least eight independent biological experiments (** $p < 0.01$).

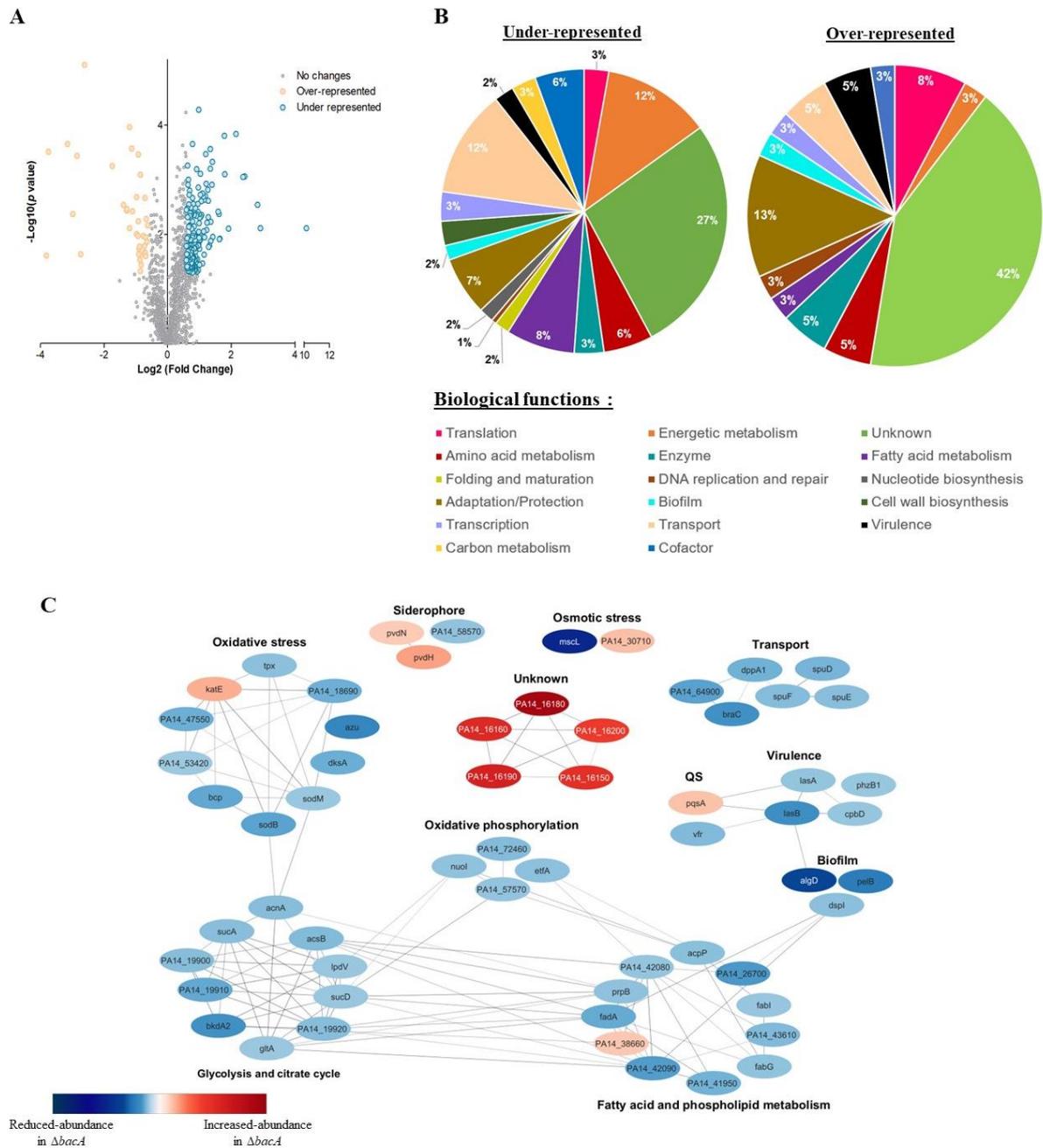


Figure 3. Differential quantitative proteomic analyses of WT strain and $\Delta bacA$ mutant grown as biofilms.

(A) Volcano plot representation of differential proteomics analysis. Circles representing proteins are placed according to their statistical p-value and their relative abundance ratio (log 2-fold change). Grey circles correspond to proteins that do not present significant differential abundance. (B) Classification of the differentially represented proteins (under-represented on the left and over-represented in the right) according to their biological processes using the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database. (C) Protein-protein interaction network for proteins displaying the most pronounced differential abundances between the *P. aeruginosa* WT strain and the $\Delta bacA$ mutant grown as biofilm. Nodes are colored according to protein abundance: red color corresponds to accumulated proteins in the mutant whereas blue color is used for proteins of decreased abundance. Edges indicate protein-protein interactions.

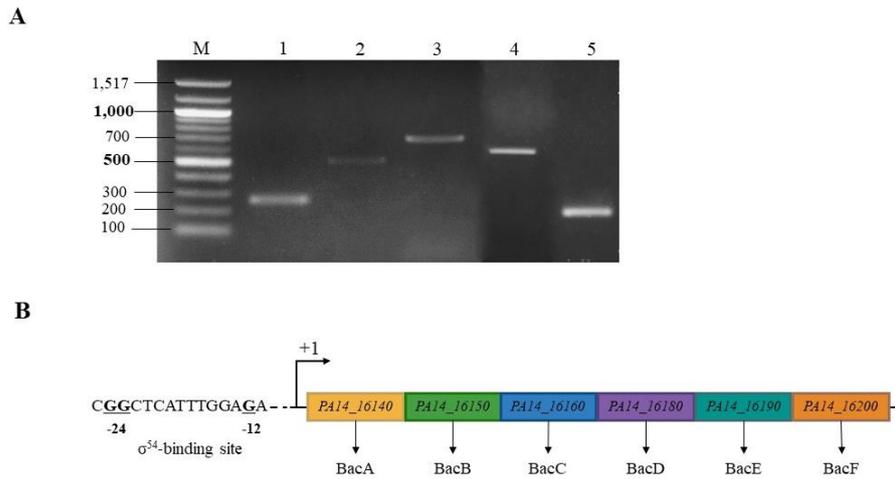


Figure 4. BAC system is coding by an operon of 6 genes regulated by a σ^{54} sigma factor.

(A) Electrophoretic gel from RT-PCR experiment. Lane 1: transcript *bacA-bacB*, lane 2: transcript *bacB-bacC*, lane 3: transcript *bacC-bacD*, lane 4: transcript *bacD-PA14_16190*, lane 5: transcript *PA14_16190-16200*, lane M: 100 bp ladder molecular size marker (bp). (B) Organization of the *bac* operon.

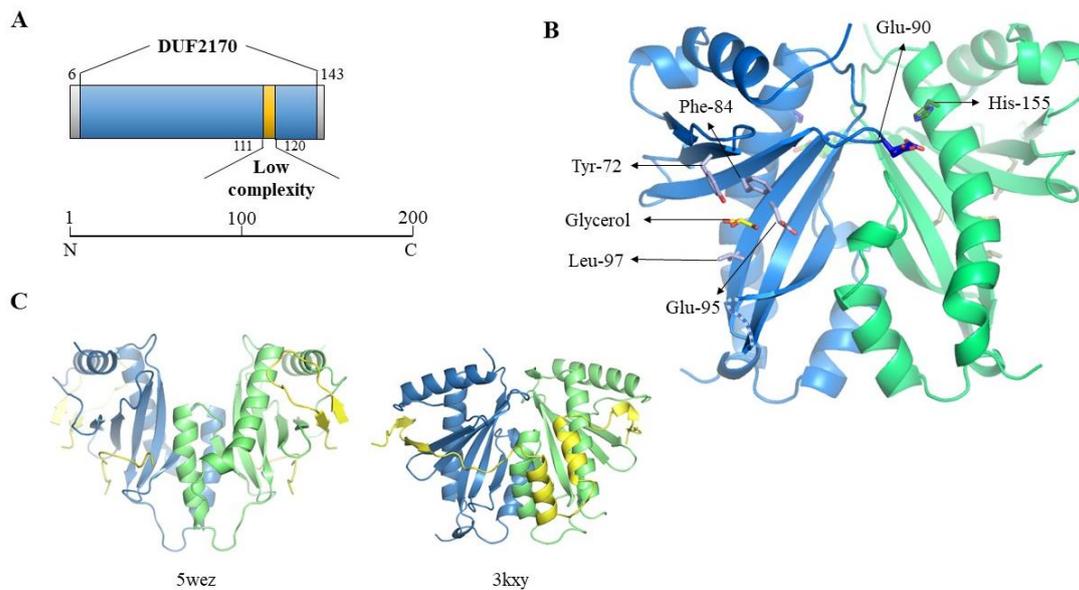


Figure 5. Crystallographic structure of BacA.

(A) Schematic representation of the DUF2170 domain identified using Interpro database. (B) Structure of one of the two dimers of BacA, reconstructed after application of the crystallographic symmetries. The 3D structure is oriented in order to highlight the regions expected to interact with the polypeptide it is supposed to chaperon as solved in the structure of two other complexes involving a chaperon CesT/Tir (5wez) and ExsC/ExsE (3kxy). The two monomers are coloured in blue and green respectively. One molecule of glycerol has been identified in the structure, localized in the pocket formed by four residues (Tyr-72, Phe-84, Glu-95, Leu-97) in the hollow of the concave beta sheet. The two residues solved in two alternative positions (Glu-90, His-155, see main text) are also indicated. The interacting molecules in B, C and D are coloured in yellow. The missing loop 130-136 is schematized as a dotted line. (C) Crystal structure of the Tir-CesT effector-chaperone complex (left part) and of the ExsC-ExsE Complex (right part). The PDB numbers and structures presented were obtained from the PDB website (<https://www.rcsb.org/>).

Supplementary Material

BacA : a new regulator that contributes to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

Lisa WALLART¹, Mohamed Amine BEN MLOUKA^{1,2}, Brahim SAFFIEDINE¹, Laurent COQUET^{1,2}, Hung LE^{1,2}, Julie HARDOUIN^{1,2}, Thierry JOUENNE¹, Gilles PHAN³, Marie-Christine KEIFFER-MEYER⁴, Eric GIRARD⁵, Isabelle BROUTIN³, Pascal COSETTE^{1,2,*}

¹ Polymers, Biopolymers Surface Laboratory, UMR 6270 CNRS, Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

² HeRacLeS-PISSARO, INSERM US 51, CNRS UAR 2026, Normandie Univ, Mont-Saint-Aignan, France

³ CiTCoM, CNRS, Université Paris Cité, Paris, France

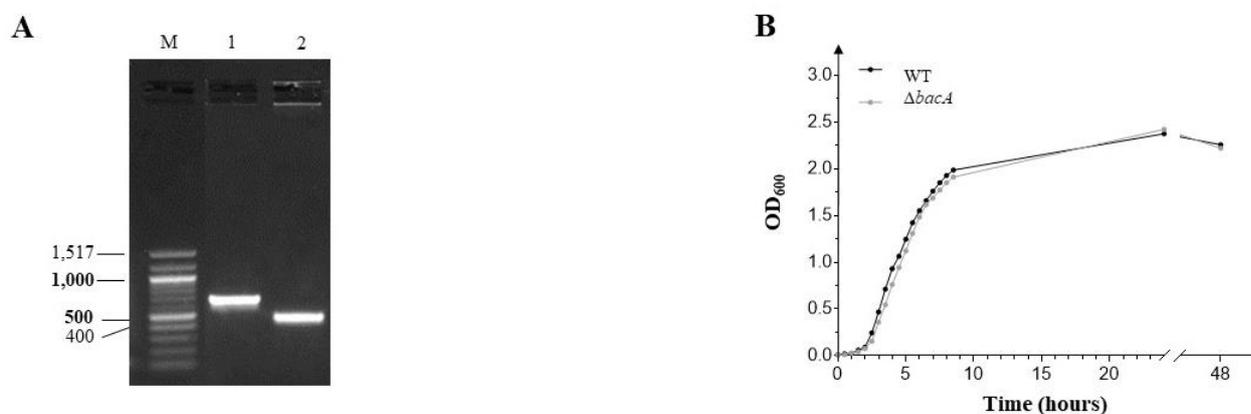
⁴ Glyco-MeV Laboratory, SFR NORVEGE FED 4277, Carnot I2C, IRIB, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen, France

⁵ IBS, UMR 5075 CEA CNRS UJF, Grenoble, France

* Correspondence :

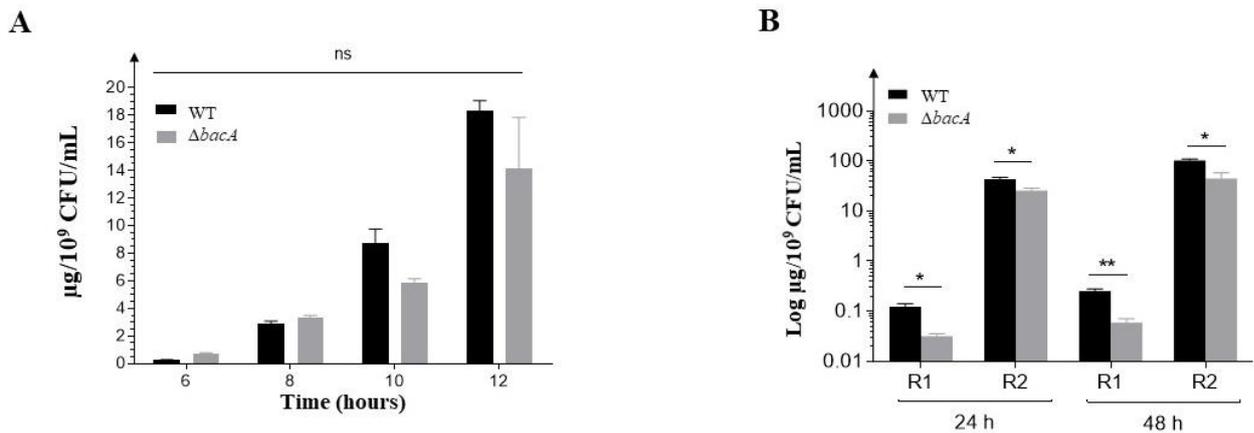
Pr. P. Cosette

pascal.cosette@univ-rouen.fr



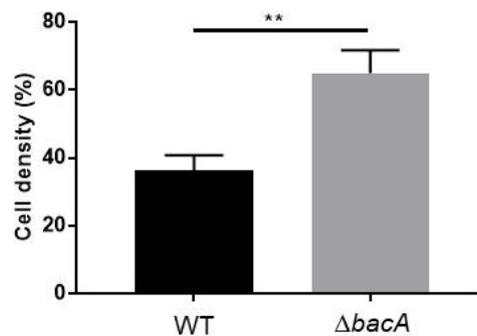
Supplementary Figure 1. Verification of the *bacA* mutant.

(A) MARxT7 transposon insertion verification. Lane 1: *bacA* mutated, lane 2: wild-type *bacA*, lane M: 100 bp ladder molecular size marker (bp). **(B)** Growth curves of the WT strain and *bacA* mutant in LB under 140 rpm at 37°C. Data represent mean values (\pm SEM) from three independent biological experiments.

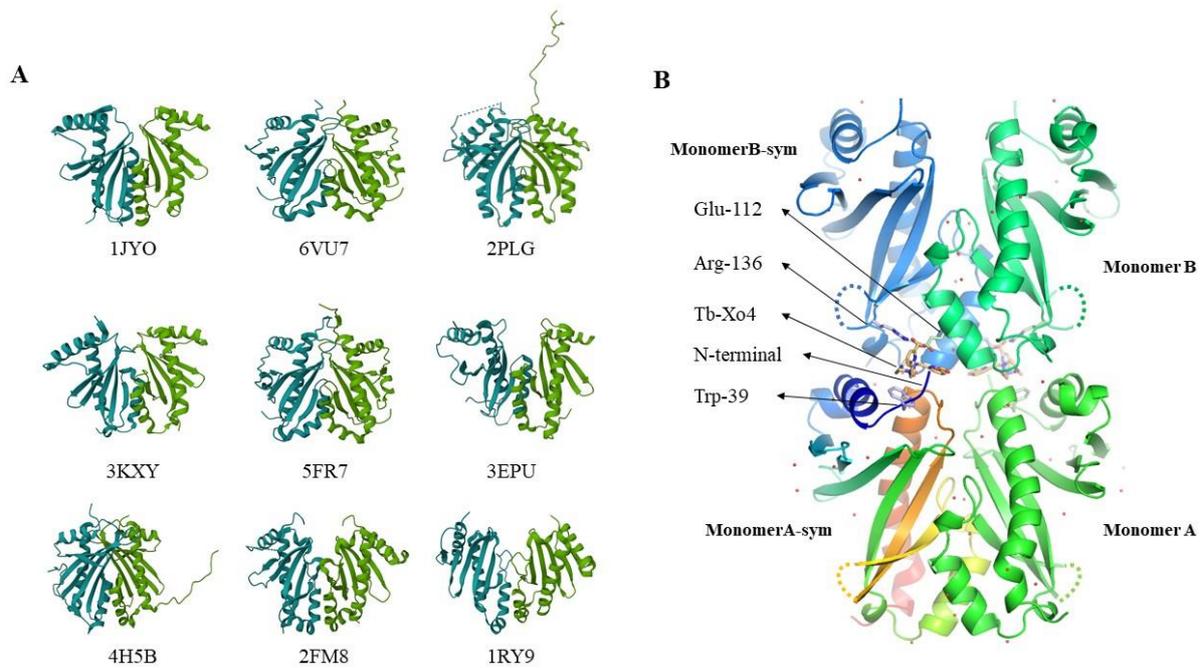


Supplementary Figure 2. Impact of the bacA mutation on the rhamnolipids secretion.

(A) Impact of the *bacA* mutation on rhamnolipid production. Rhamnolipids were detected by LC-MS/MS from supernatants of LB culture at specific times of growth. Data represent mean values (\pm SEM) from three independent biological experiments (ns, non-significant, 2way ANOVA test). **(B)** Amount (log scale) of the two most abundant rhamnolipids, i.e the Rha-C₁₀-C₁₀ (R1) and the Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (R2). Data represent mean values (\pm SEM) from three independent biological experiments (**p=0.01 ; *p<0.05, Student's t-test).



Supplementary Figure 3. Quantification of A549 cellular density after 2 h of infection with *P. aeruginosa* WT and *bacA* mutant, based on fluorescence measurements from confocal microscopy images. Quantification were realised from at least ten acquisitions from four independent biological experiments (**p<0,01).



Supplementary Figure 4. (A) Comparison of the BacA 3D-structure obtained by crystallography with numerous secretion type-III chaperones or genetic regulator proteins. The PDB numbers and structures presented were obtained from the PDB website (<https://www.rcsb.org/>). The protein ShcA (4gt6) is not represented because it is not available in dimer without its interacting ligand. **(B)** Structure of the two monomers of BacA present in the crystallographic asymmetric unit represented in two different green. The two dimers are reconstituted by application of the first order symmetry axis of the space group P6₅22 (symmetry-generated monomer B called monomerB-sym (blue) and symmetry-generated monomer A called monomerA-sym (rainbow)). Molecules of Tb-Xo4 are represented in light-pink sticks. The amino-acids making direct contacts with Tb-Xo4 are represented in sticks, in the same colour as the monomer they belong to (N-terminus and Trp-39 from the monomerA-sym in blue, Glu-112 from molecule B in green, and Arg-136 from the monomer-sym in blue).

Table S1. Primers used in this study.

Primer name	Sequence (5'>3')	Amplicon size (bp)
PCR		
PA14_WT_F	GCTCATTGGAGAAGGAGGAAGAC	478
PA14_WT_R	TTTCAGGTAGCCGGCGTAGACTT	
PA14_Δ16140_F	GCTCATTGGAGAAGGAGGAAGAC	1472
PA14_Δ16140_R	TTTCAGGTAGCCGGCGTAGACTT	
RT-PCR		
PA14_16140/50_F	TTCAACGAAGAGGTCCTGCT	233
PA14_16140/50_R	AGCTTGCTCCATACCGTCAT	
PA14_16150/60_F	TACGGCAACTCGAAGAGCAA	497
PA14_16150/60_R	ACGCCGTTGAGTTTCAGCTT	
PA14_16160/80_F	CCGGGCTGATCCTGAAAGTT	635
PA14_16160/80_R	GATCACCTCGATGATGCGGT	
PA14_16180/90_F	CGAGGGCGACTTCTTCAACT	557
PA14_16180/90_R	GCGATGCAGTTGTTTTTCGGT	
PA14_16190/20_F	TGATCAAGGTGATGGACCGC	501
PA14_16190/20_R	GTCCAATCCGTCGAAGTCCA	

Table S2: Data recording and refinements statistics for the dataset recorded on the PX1 beamline at the synchrotron SOLEIL. (Data from the highest resolution bin are in parentheses).

Data collection and integration statistics	BacA-TB-XO4
Wavelength (Å)	1.649
space group	P6(5)22
Cell parameters (Å) a = b; c	68.86; 281.07
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.93
Percentage of solvent (%)	58.0
Resolution limits (Å)	46.85 - 2.7 Å (2.83-2.70)
No of measured reflections	434678 (56933)
No of unique reflections	11686 (1478)
Rmerge (%) ^a	16.9 (109.9)
Rpim (%)	3.7 (24.3)
CC1/2 (%)	99.9 (95.4)
Completeness (%)	99.70 (99.3)
Redundancy	21.40 (21.10)
I/σ(I)	22.9 (5.0)
Anomalous measurability limit (Å)	2.82
Figure of merit	0.829
Phase error (°)	32.27
B Wilson (Å ²)	40.66
Refinement statistics by resolution	46.85 - 2.7 Å
Rwork/Rfree (% / %)	21.03/26.88
No of used reflections	11472
No of refined atoms	2199
No of amino-acids	276
No of water molecules	27
No of alternates positions	2
No of additives	2
rms bonds deviation (Å)	0.011
rms angle deviation (°)	0.575
Average thermal B factors (Å ²)	46.96
Ligands thermal B factors (Å ²)	75.54
Ramachandran Favored (%)	95.52
Ramachandran Outliers (%)	0.75

(a) Rmerge is the standard agreement factor = $\sum hkl \sum j (|I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum hkl \sum j (I_{hkl,j})$, and Rpim is the precision-indicating merging R-factor = $\sum H p(1/(n-1) \sum j (|I_{H,j} - \langle I_H \rangle|) / \sum H \sum j (I_{H,j})$. The Rmerge was always rather high but trusting on the Rpim was always the guideline for data quality.

La Table S3. étant volumineuse, elle est consultable à l'annexe 1.

Table S4. Structural homology search using I-TASSER with the BacA as query

Position	PDB	TM-score	RMSD	Description	Organism	DOI
1	1jyo	0.792	1.88	SicP, Type-III secretion chaperone	<i>Salmonella enterica</i>	10.1038/35102073
2	6vu7	0.732	2.55	YbjN, putative transcription regulator	<i>Escherichia coli</i>	
3	3kxy	0.723	2.44	ExsC, Type-III secretion chaperone/transcription regulator	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.1021/bi100432e
4	5fr7	0.718	2.77	AmyR, amylovoran repressor, YbjN protein family	<i>Erwinia amylovora</i>	10.1371/journal.pone.0176049
5	3epu	0.703	2.50	STM2138, Type-III secretion chaperone	<i>Salmonella enterica</i>	
6	4g6t	0.7	2.40	ShcA, Type-III secretion chaperone	<i>Pseudomonas syringae</i>	10.1128/JB.01621-12
7	2plg	0.68	2.79	T110839, putative sensory transduction regulator	<i>Synechococcus elongatus</i>	10.1074/jbc.M400077200
8	4h5b	0.678	2.62	DR_1245, YbjN domain-containing protein	<i>Deinococcus radiodurans</i>	10.1371/journal.pone.0056558
9	2fm8	0.670	3.01	InvB, Type-III secretion chaperone	<i>Salmonella enterica</i>	10.1016/j.molcel.2006.01.026
10	1ry9	0.653	3.07	Spa15, Type III secretion chaperone	<i>Shigella flexneri</i>	10.1038/sj.embor.7400144

III. Discussion et conclusion

Lors de sa découverte, le système BAC était à l'origine un cluster de 4 protéines : BacA, BacB, BacC et BacD, toutes de fonction et de structure inconnues. L'étude de BacB avait démontré l'implication de ce système dans la pathogénicité et dans la formation de biofilm. Les travaux effectués ici sur BacA renforcent cette hypothèse au regard des phénotypes observés lorsque le gène *PA14_16140* est muté. Comme évoqué dans le chapitre 2 de la partie bibliographique, la formation de biofilm est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs acteurs. La diminution de la sécrétion des rhamnolipides et la perte de mobilité swarming du mutant participent probablement à la déstructuration du biofilm et à sa faible épaisseur observée.

L'utilisation de la protéomique a montré ici tout son intérêt. D'abord menée dans le but de comprendre les phénotypes observés, elle a, dans le même temps, mis en lumière de nouvelles pistes d'études.

La première découverte concerne l'organisation génique du cluster *bac* qui est finalement composé de 6 gènes organisés en opéron appelé *bacABCDEF*. En amont de cet opéron se trouve un site de fixation au facteur sigma σ^{54} . Ceci sous-entend que la transcription de *bacABCDEF* se fait en réponse à des stimuli environnementaux. Ainsi, on retrouve là encore des similitudes avec le système Psp d'*E. coli*, l'expression de *pspA* étant sous le contrôle du facteur sigma σ^{54} .

L'autre découverte majeure concerne le potentiel rôle de BacA. BacA est la première DUF2170 caractérisée chez *P. aeruginosa*, mais aussi la première DUF2170 dont la structure est élucidée grâce à nos travaux. D'après les résultats bio-informatiques et sa structure, BacA semble posséder un rôle hybride de régulateur et de chaperonne.

À ce jour, il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les protéines DUF2170. La superfamille DUF pour « domain of unknown function », regroupe toutes les protéines dont la fonction n'est pas caractérisée. Peu de littérature concerne ces domaines mais il s'est avéré que les DUF sont conservés et parfois essentiels à la fonction de la protéine (Goodacre et al., 2013).

Les rares fois où ce domaine a été mentionné c'est lors d'une étude phylogénétique réalisée sur PspA par l'équipe de Ravi et collaborateurs (Ravi et al., 2020). Les environnements géniques qui entourent le gène codant pour une PspA homologue sont extrêmement variés et deux, identifiés chez les protéobactéries, coïncident avec nos premiers résultats. Ils possèdent un gène codant une chaperonne « CesT-Tir-DUF2170 » suivie d'un gène codant pour une protéine PspA homologue.

Le premier contexte génique est retrouvé chez *Shewanella oneidensis*. Cependant il code une spermidine synthase, ce qui n'est pas le cas du système BAC. Il reste donc le second contexte

génique décrit chez *Dokdonia donghaensis* mais sur lequel aucune donnée expérimentale n'existe.

Nous avons néanmoins comparé le contexte génique de *D. donghaensis* à notre système et ce grâce à des outils bio-informatiques. Cette étude fait l'objet de la partie 2.

Partie 2 :
Analyse bio-informatique
approfondie, lien avec la
littérature et tentative
d'annotation fonctionnelle
des protéines BAC

I. La bio-informatique comme premier outil de réponse à une question biologique

La bio-informatique est un outil développé à l'origine par les informaticiens pour répondre aux questions des biologistes. Elle se situe donc à la frontière entre l'informatique et la biologie.

Les progrès des techniques d'analyses ont considérablement augmenté la quantité de données et ce dans tous les domaines (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique). Cette quantité massive de données devait être stockée et consultable. C'est dans ce contexte que les banques de données ont vu le jour. On distingue deux types de bases de données : les primaires et les secondaires.

Les bases de données primaires, aussi appelées généralistes, gèrent, archivent et mettent à disposition des données expérimentales qui proviennent de tous les champs d'applications. À l'inverse, les bases de données secondaires, aussi appelées spécialisées, gèrent des ressources dédiées à un seul type d'organisme ou à une thématique donnée. Ici nous évoquerons de façon non exhaustive uniquement les bases de données en lien avec l'étude des protéines. Il faut noter que certaines banques sont spécialisées dans les études des eucaryotes, des procaryotes ou des plantes.

Les banques de données primaires sont généralement des banques de séquences protéiques. Pendant de nombreuses années trois banques ont existé. La banque Swiss-Prot qui possède une excellente qualité d'annotation (Boeckmann et al., 2003), la banque TrEMBL qui contient des séquences protéiques obtenues *in silico* et la banque PIR (protein information resource) qui fût la première à proposer une classification des séquences protéiques selon les degrés de similarité (Wu et al., 2003). En 2002, ces banques se sont regroupées sous l'initiative d'un consortium international, afin de créer la banque UniProt (Universal Protein resource) (UniProt Consortium, 2008). Dans le domaine structural, la banque de données de référence est la PDB (protein data bank), elle archive toutes les structures des protéines élucidées mais aussi celles de quelques ARNt (Berman et al., 2000).

Les interfaces de ces banques sont assez similaires et contiennent plusieurs entrées : *i*) les informations générales avec un identifiant unique, un numéro d'accession, une définition et la taxonomie, *ii*) les références bibliographiques, s'il y en a, associées à la séquence et *iii*) les annotations biologiques appelées « features » (caractéristiques).

La consultation de ces banques de données est généralement le point de départ pour caractériser de façon exhaustive une protéine ou un groupe de protéines d'intérêt. Lorsqu'une protéine est inconnue (aussi appelée hypothétique), les données bio-informatiques sont très utiles pour émettre des hypothèses quant à sa structure et/ou sa fonction. Il est cependant

indispensable de vérifier expérimentalement ces prédictions bio-informatiques afin de confirmer ces hypothèses.

Il existe une multitude de base de données et il est aujourd'hui difficile de les catégoriser. En effet, certains outils intègrent à la fois une base de données, un outil d'interrogation et un outil de navigation dans le génome. Pour ne pas se perdre dans ce flux de données et avant de mener toute étude bio-informatique il est important de savoir à quelle question biologique la prédiction bio-informatique doit répondre.

Les outils utilisés pour cette étude sont listés dans la partie Matériel et Méthode (cf Matériel et Méthode – Section VIII.)

II. Contexte et objectifs de l'étude

Compte tenu des similitudes observées entre le système BAC et le système Psp présent chez *D. donghaensis* et les protéobactéries en général, une étude comparative a été menée sur ces deux systèmes.

Ce système Psp comprend : *i*) un gène codant une protéine chaperonne contenant un domaine DUF2170, *ii*) un gène codant une protéine homologue à PspA, *iii*) un gène codant une protéine contenant un domaine transmembranaire, un domaine Band7, une région coiled-coil et un domaine flotilline, *iv*) un gène codant une protéine à activité ATPase AAA+ et une extrémité N-terminale formée de région coiled-coil et de répétition de brins- β , *v*) un gène codant une protéine à trois domaines transmembranaires et présentant des similitudes avec la protéine YqiJ d'*E. coli* ou YuaF de *B. subtilis*. Enfin, chez certaines protéobactéries, un gène codant une phospholipase D est aussi présent.

En l'état actuel de nos connaissances, le système BAC implique BacA (une DUF2170), BacB qui s'apparente à une PspA, BacC prédite comme une protéine de la membrane cytoplasmique et BacD localisée expérimentalement dans la membrane externe (Ben Mlouka, 2014; Macé et al., 2008; Saffiedine, 2019). Nous n'avons aucune information sur les deux protéines nouvellement découvertes : BacE et BacF.

L'étude bio-informatique a été réalisée sur BacB, BacC, BacD, BacE et BacF. La stratégie employée a été identique pour toutes les protéines (**Figure 31**). La séquence en acides aminés de chacune des protéines a été obtenue à partir de la base de données Pseudomonas Genome Database (souche *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 - Assembly GCF_000014625.1.) ou Uniprot et a été ensuite analysée par les outils bio-informatique choisis en amont.

Dans notre cas, nous avons choisi PSORTb (version 3.0), Phobius et DeepTMHMM (version 1.0.24) pour prédire la topologie et la localisation cellulaire et Interpro (version 96.0) pour la prédiction de domaines fonctionnels. Les structures secondaires et tertiaires ont été prédites respectivement par PSiPRED (version 4.0) et les logiciels de modeling ou AlphaFold.

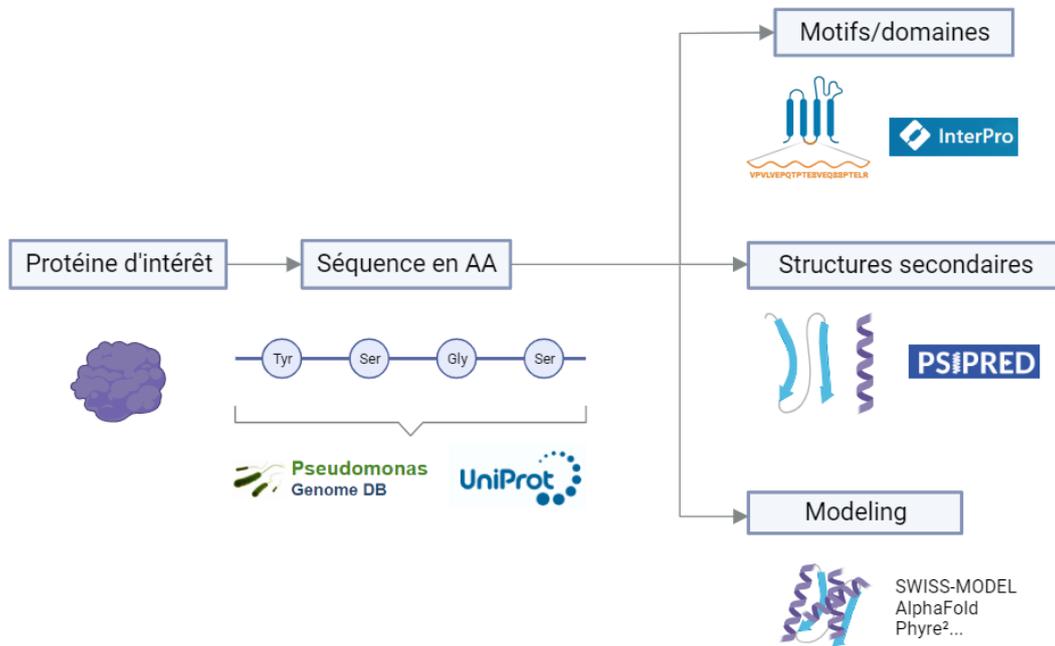


Figure 31 | Stratégie employée pour l'étude bio-informatique des protéines du système BAC.
AA : acides aminés

III. Résultats

III.1 La protéine BacB

D'après la base de données Pseudomonas Genome Database, le gène *PA14_16150* code une protéine de 24,9 kDa et de 231 acides aminées. Sur la base de données Uniprot, BacB est annotée comme une « putative phage shock protein ». Cette annotation est à l'état « unreviewed » car elle provient de la base de données TrEMBL, dont les annotations ne sont pas vérifiées.

La protéine BacB est prédite comme cytoplasmique (indice de confiance de 8,96/10 soit au-dessus du score de 7,5 conseillé comme étant le score minimum pour un résultat fiable). Le même résultat est obtenu avec DeepTMHMM (probabilité de 1/1). Phobius prédit BacB comme non cytoplasmique mais n'identifie pas de domaine transmembranaire ni de peptide signal, ce qui semble peu cohérent (annexe 2). Néanmoins, le Dr. Ben Mlouka, dans ces travaux de thèse, l'a localisé dans tous les compartiments cellulaires grâce à une analyse protéomique effectuée dans chacun des compartiments cellulaires (Ben Mlouka, 2014).

La protéine BacB contient un domaine « PspA/IM30 » qui parcourt pratiquement toute la protéine (en bleu, IPR007157). Au sein de ce domaine, se trouve une région coiled-coil (en orange). La dernière zone grisée n'a pas reçu d'annotation par les logiciels de prédiction (Figure 32).

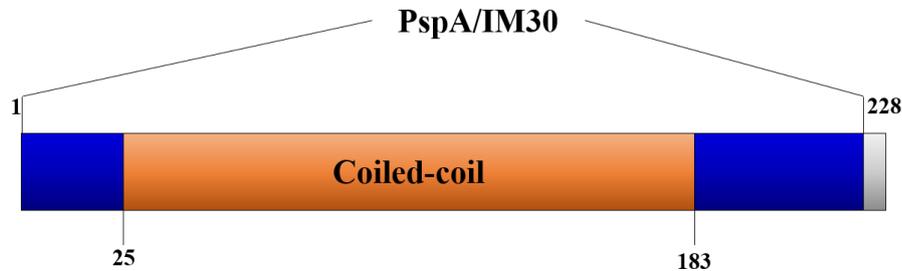


Figure 32 | BacB contient un domaine PspA/IM30.

Les régions coiled-coil adoptent une structure où plusieurs hélices α se « surenroulent ». Ces régions sont connues comme permettant une dimérisation voire une trimérisation des chaînes peptidiques. Ces régions sont notamment observées chez des protéines structurales et des protéines régulatrices.

La présence du domaine PspA/IM30, suppose que BacB pourrait être un nouveau membre de la famille PspA/IM30. Cette famille regroupe toutes les protéines (provenant de la base de données Uniprot) considérées comme des PspA homologues, certaines sont simplement annotées bio-informatiquement et pour d'autres la prédiction a été vérifiée expérimentalement. En cherchant dans la base de données Interpro le mot clé « PspA/IM30 » (IPR007157), il existe à ce jour environ 26 000 protéines annotées, tout règne confondu. Seulement 15 sont à l'état « reviewed » dont les plus connues sont PspA et Vipp1.

La protéine PspA, pour « phage shock protein A », d'une une masse de 25,5 kDa est cytoplasmique mais parfois localisée à la périphérie de la membrane.

La protéine Vipp1 (vesicle-inducing protein in plastids 1) est l'homologue de PspA chez les plantes. Elle est retrouvée dans les chloroplastes et chez les cyanobactéries et joue un rôle important dans la formation et le maintien de la membrane des thylakoïdes (Heidrich et al., 2017). Les thylakoïdes, situés à l'intérieur des chloroplastes, sont des compartiments contenant la chlorophylle et impliqués dans la photosynthèse. Lors de sa découverte en 1994, elle est d'abord nommée IM30 pour « inner membrane 30kDa » (H. Li et al., 1994). Plus tard, en 2001, elle fût renommée Vipp1, car la délétion de son gène empêcherait la formation de vésicules à faible température chez *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (Kroll et al., 2001). En revanche, aucune données supplémentaires récentes ne sont venues confirmer ce résultat.

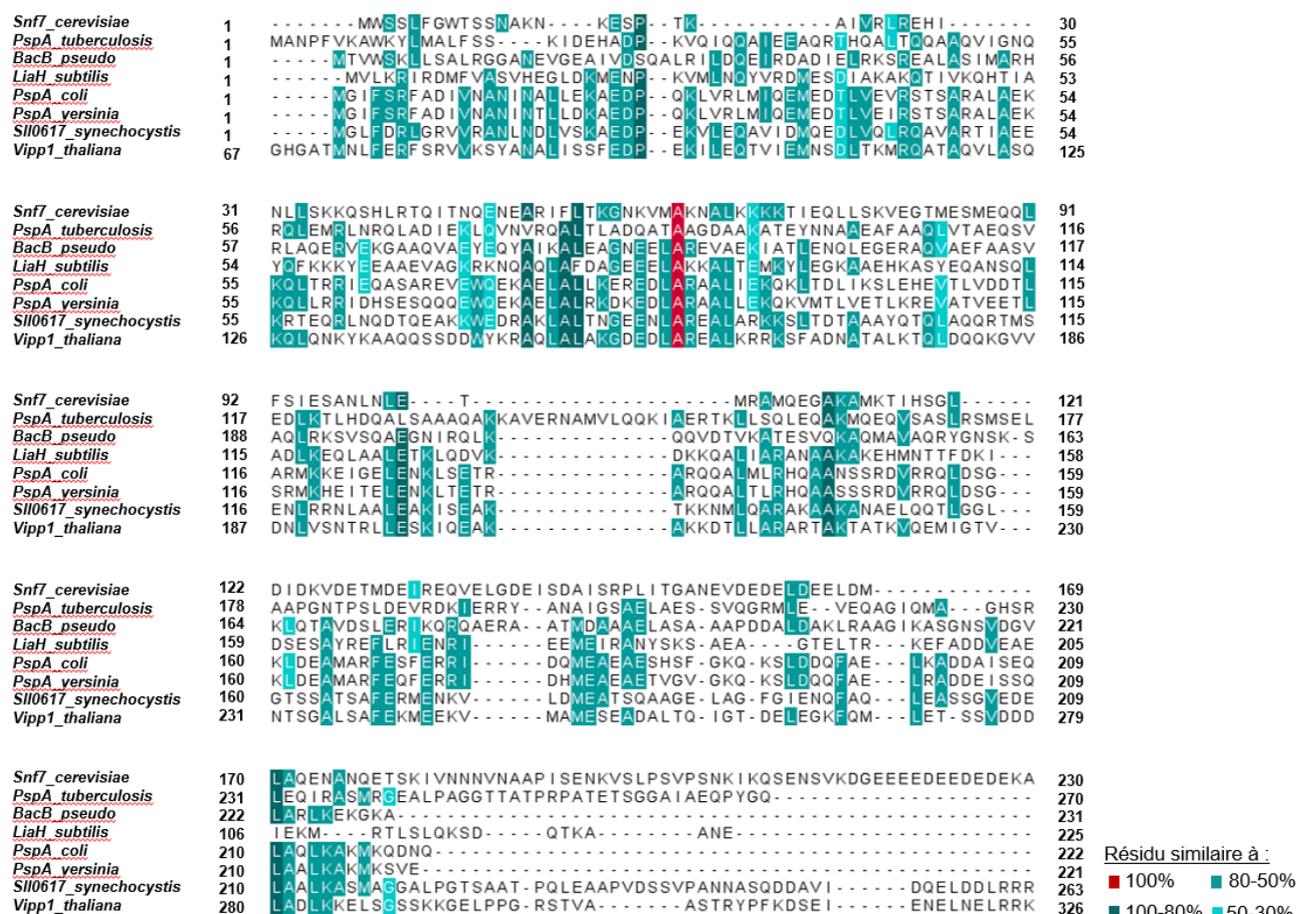
Ainsi, même si certains auteurs l'appellent encore IM30 ou bien Vipp1, nous avons choisi de conserver Vipp1, car c'est ainsi qu'elle est annotée dans les bases de données.

Nous avons donc vérifié si BacB était homologue aux protéines qui composent cette famille. Pour réaliser l'alignement, nous avons sélectionné des protéines provenant de règnes divers et dont les données expérimentales valident leur annotation bio-informatique « PspA/IM30 ». Dans la liste se trouvent PspA d'*E. coli* (souche K12), LiaH de *B. subtilis* (souche 168), PspA de *Y. pseudotuberculosis*, PspA de *M. tuberculosis* (souche H37Ra), sll0617 de *Synechocystis* sp. (Souche PCC6803 / Kazusa), Snf7 de *S. cerevisiae* (Baker's yeast) et Vipp1 d'*A. thaliana*.

D'après l'alignement (**Figure 33a**), quelques acides aminés majoritairement hydrophobes sont conservés à plus de 80% et seule l'alanine, surlignée en rouge, est conservée dans toutes les séquences. En dehors de ces acides aminés, la majorité des résidus sont peu ou pas conservés. Cela se traduit d'ailleurs par de faibles pourcentages d'identité (**Figure 33b**). C'est avec Vipp1 et sll0617 que BacB partage le plus d'identité de séquence avec 22,48% et 22,37%, respectivement (**Figure 33b**).

Ces faibles pourcentages d'identité ne sont pas surprenants car ils sont aussi retrouvés entre toutes les autres protéines prises deux à deux (données non présentées). Par exemple, Vipp1 et PspA n'ont que 27,87% d'identité de séquence. L'exception concerne PspA d'*E. coli* et PspA de *Y. pseudotuberculosis* avec 78,28% d'identité de séquence.

a



b

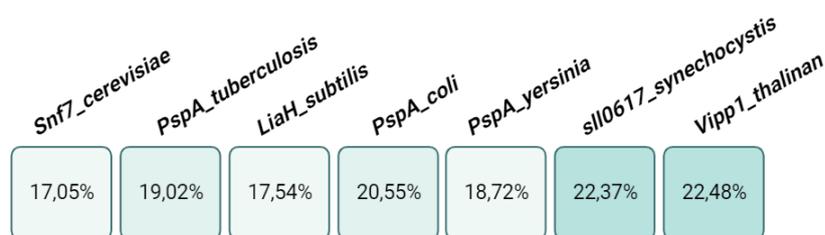


Figure 33 | Comparaison entre les protéines de la famille PspA/IM30.

Alignement réalisé avec Clustal Omega et modifié à l'aide de Jalview (A. M. Waterhouse et al., 2009) (a). Pourcentage d'identité entre la protéine BacB et les autres protéines de l'étude (b). Les résidus sont coloriés selon leur pourcentage d'identité (option BLOSUM62 score). Les régions à forte similarité sont encadrées en pointillé noir.

Les membres de la famille PspA/IM30 sont connus pour leur faible homologie de séquence et leur forte homologie de structure. Parmi les 15 protéines « reviewed », seules Vipp1 (accession PDB 6ZVR, (J. Liu et al., 2021)) et PspA (accession PDB 7ABK, (Junglas et al., 2021)) ont leur structure partiellement élucidée. Les structures secondaires et tertiaires de BacB ont été prédites puis comparées à celles de Vipp1 et PspA. Pour la comparaison des structures tertiaires ce sont les modèles prédits par Swiss-Model qui ont été utilisés.

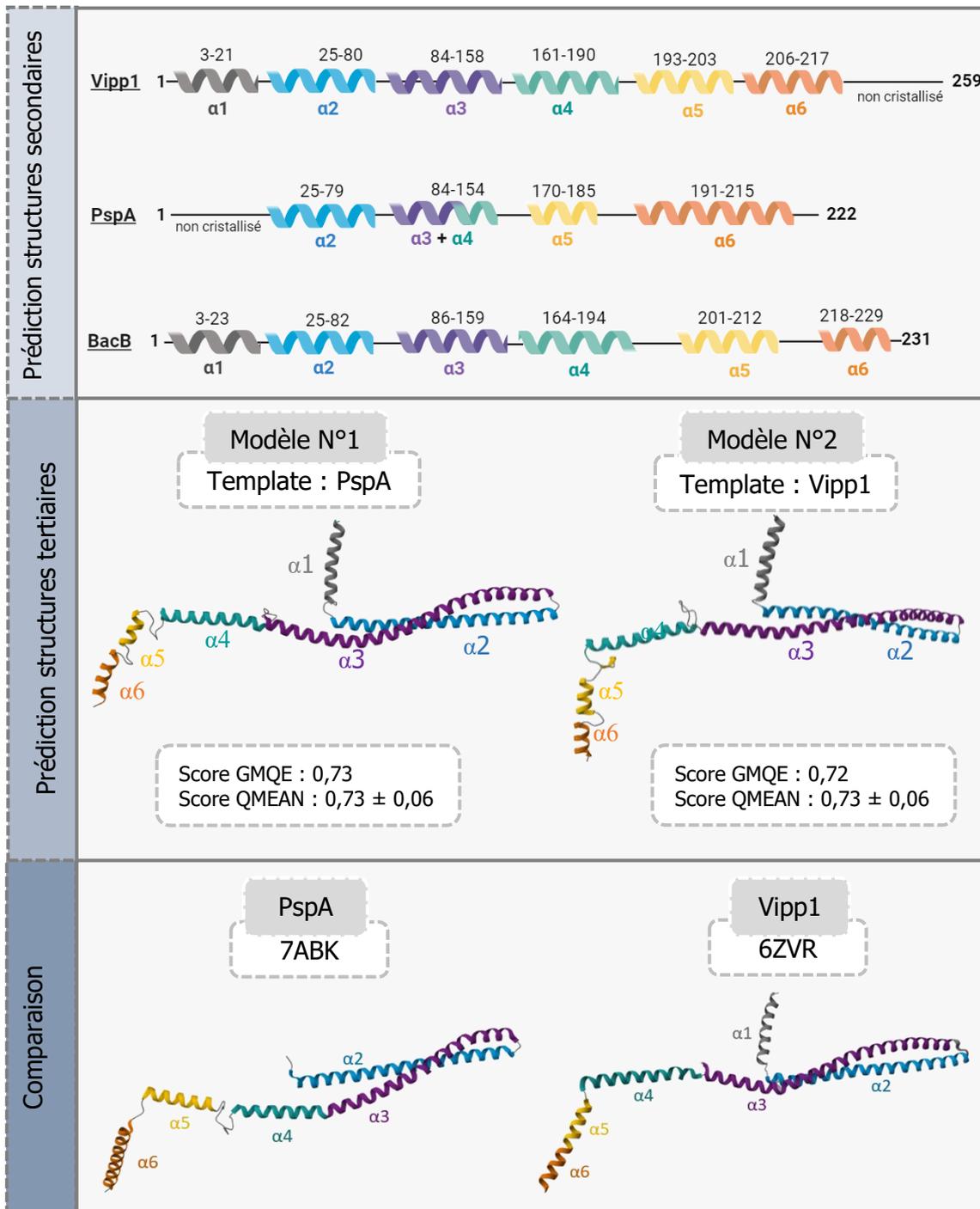


Figure 34 | La protéine BacB est un homologue structural des protéines PspA et Vipp1.

Les structures de PspA et Vipp1 ont été obtenues à partir des accessions PDB indiquées dans la figure. Les structures ont été modifiées grâce au logiciel Mol*(Star). L'hélice α_1 de PspA et α_7 de Vipp1 ne sont pas représentées par manque de données cristallographiques.

Comme PspA et Vipp1, BacB est composée uniquement de structures en hélice α , qui couvrent environ 85% de la protéine. En détails, ce sont 6 hélices, chacune séparée par des régions non structurées, qui parcourent BacB. Ces prédictions sont en accord avec les résultats du dichroïsme circulaire réalisé durant les travaux du Dr. Macé (Macé et al., 2008). Ces structures secondaires sont fortement similaires à celles de Vipp1 et PspA mais aussi à l'ensemble des membres de la famille PspA/IM30 (Figure 34, premier rectangle et annexe 2).

En effet, tous les membres de cette famille possèdent cette organisation hélicoïdale conservée, d'environ 220 acides aminés, désignée sous le terme de domaine PspA (Westphal et al., 2001). L'analyse phylogénétique de Westphal et collaborateurs, a démontré que Vipp1 proviendrait à l'origine d'une duplication de gène *pspA* de *E. coli*. Ces deux protéines partagent une faible identité de séquence mais possèdent une structure secondaire fortement conservée (Bultema et al., 2010). Ainsi l'extrémité N-terminale de Vipp1 composée de 6 hélices α , sera renommée « domaine PspA ». La protéine Vipp1 contient une 7^{ème} hélice α au niveau de son extrémité C-terminale (Otters et al., 2013; Westphal et al., 2001).

D'après le domaine PspA/IM30 identifié précédemment et les fortes similitudes de structures secondaires, BacB semble aussi posséder ce domaine PspA.

La première tentative de modélisation de la structure tertiaire de BacB sur Swiss-Model a généré deux modèles de conformation très proches. Pour générer les modèles N°1 et N°2, le logiciel a choisi comme template les structures hélicoïdales de PspA et de Vipp1, respectivement. Pour ces deux modèles, on trouve les 6 hélices α ce qui corrèle avec les prédictions PSIPRED. Ces hélices sont séparées par des coudes c'est-à-dire des changements brutaux de direction du squelette protéique, ici colorés en gris sur la **Figure 34** (rectangle du milieu). Ainsi, les hélices α_1 , α_5 et α_6 sont perpendiculaires aux hélices α_2 , α_3 et α_4 . Les hélices α_2 et α_3 apparaissent surenroulées ce qui coïncide avec la région coiled-coil identifiée précédemment (**Figure 34**, rectangle du milieu).

Les scores GMQE (global model quality estimate) et QMEAN estiment entre 0 et 1 la qualité du modèle généré en sachant que plus le score est proche de 1 plus le modèle est fiable. Le score GMQE est dépendant du pourcentage de recouvrement obtenu lors de l'alignement des séquences de notre protéine et du template. Le score QMEAN est quant à lui indépendant du pourcentage de recouvrement et estime la déviation (en pourcentage) de chaque résidu et de la structure entière par rapport à la structure native du template. Les deux modèles obtenus ont tous deux un QMEAN allant de 0,67 à 0,79 et un GMQE de 0,73 reflétant une modélisation de bonne qualité.

Le choix des templates PspA et Vipp1 confirme que BacB, de par sa structure, pourrait être un membre de la famille PspA/IM30. L'homologie de structure la plus flagrante concerne le surenroulement des hélices α_2 et α_3 formants la région coiled-coil (**Figure 34**, dernier rectangle).

Ainsi, BacB possède donc toutes les caractéristiques communes aux membres de la famille PspA/IM30 : *i*) un domaine PspA/IM30, *ii*) une structure exclusivement hélicoïdale avec un domaine PspA à son extrémité N-terminale, *iii*) un surenroulement d'hélices (Bultema et al., 2010; H. Li et al., 1994; Otters et al., 2013).

Cette structure fortement hélicoïdale n'est pas anodine. En effet, du fait de ces régions coiled-coil, les membres de la famille PspA/IM30 possèdent une forte capacité à s'oligomériser (Aseeva et al., 2004; Bultema et al., 2010; Hankamer et al., 2004).

L'équipe d'Hankamer fût la première à mettre en lumière un oligomère de PspA. Les 6 hélices α qui composent PspA lui confèrent des propriétés de super enroulement. La structure tridimensionnelle de la protéine PspA se présente sous la forme d'anneau composé de 9 domaines parfaitement symétriques. Par chromatographie d'exclusion, la masse du complexe a été estimée à 1023 kDa, ce qui laisse penser que chacun des 9 domaines se compose de 4 sous-unités de PspA (Figure 35).

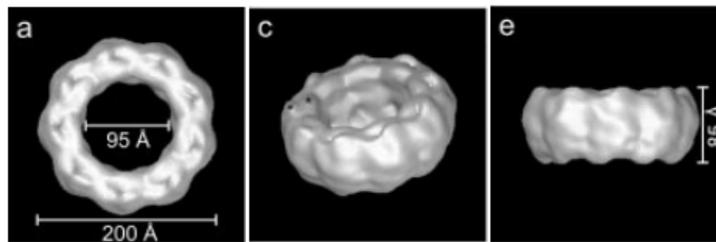


Figure 35 | Les différentes vues de la forme tridimensionnelle de l'oligomère PspA d'*E. coli*. (Hankamer et al., 2004)

D'après les analyses structurales menées sur plusieurs formes tronquées de PspA, les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$, soit le surenroulement, sont cruciales pour la formation d'un hexamère, alors qu'avec l'hélice $\alpha 1$, elles forment un dimère. Ceci sous-entend que l'hélice $\alpha 3$ régulerait négativement la formation d'hexamère mais est cruciale pour la stabilisation du dimère. L'hélice $\alpha 4$ intervient quant à elle pour former un oligomère de 36 monomères de PspA (36mer) qui prend la forme d'un anneau. Pour former cette structure, l'hélice $\alpha 4$ connecterait les dimères entre eux (Elderkin et al., 2005; Joly et al., 2009). Concernant Vipp1, des oligomères ont déjà été visualisés et les régions protéiques impliquées dans l'oligomérisation sont les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et la région contenant les hélices $\alpha 4$ à $\alpha 6$ (Thurotte & Schneider, 2019).

Alors que la taille des structures formées par PspA peut atteindre environ 1 MDa, celle de Vipp1 varie énormément avec une taille maximale de 2 MDa. En effet, plusieurs états d'oligomérisation de Vipp1 ont été observés supposant que plusieurs monomères (ou petits

oligomères) s'assemblent. À l'image de PspA, Vipp1 se présente sous différentes formes : *i*) en monomère, *ii*) en petit oligomère et *iii*) en super complexe en forme d'anneau (Aseeva et al., 2004; Hankamer et al., 2004) (**Figure 36A et B**). Les dimères sont le plus petit état d'oligomérisation permettant l'assemblage. En s'assemblant ou en se désassemblant, ils forment ou réduisent une structure en forme de tige (Fuhrmann et al., 2009) (**Figure 36C**).

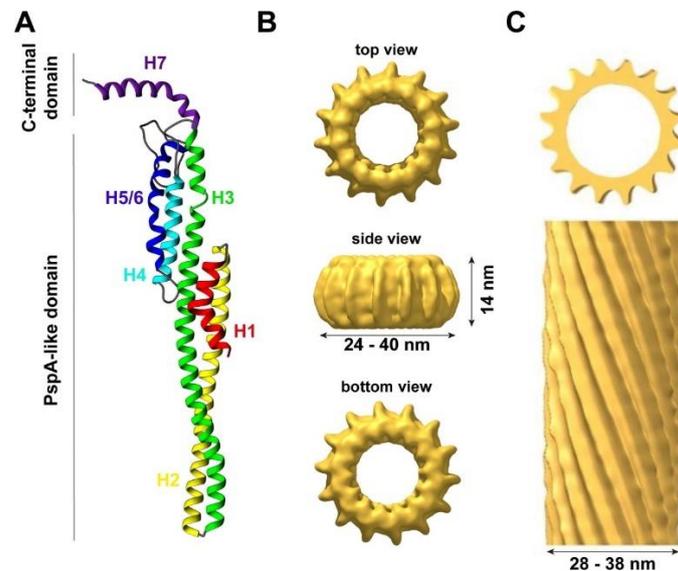


Figure 36 | Les structures de la protéine Vipp1.

Vipp1 contient 7 hélices α . Les hélices 1 à 6 forment le domaine « pspA-like » ou domaine PspA (**A**). Vipp1 forme un oligomère en forme d'anneau (**B**) ou des structures en forme de tige (**C**). (Siebenaller et al., 2019).

Chez les cyanobactéries et les végétaux supérieurs, Vipp1 a été observée à des états d'oligomérisation beaucoup plus importants tels que des doubles structures en anneaux formant une structure finale circulaire (Aseeva et al., 2004; Fuhrmann et al., 2009). Ces doubles structures sont des états intermédiaires permettant la formation de structure en forme de longue tige « rod-shaped » (ou échafaudage) grâce à l'intervention supposée d'une protéine chaperonne (C. Liu et al., 2007) (**figure 36a**). Ces états d'oligomérisation ont aussi été observés chez PspA (**Figure 37b**). L'extrémité C-terminale de Vipp1, inhiberait la formation de ces super-complexes (L. Zhang et al., 2016)

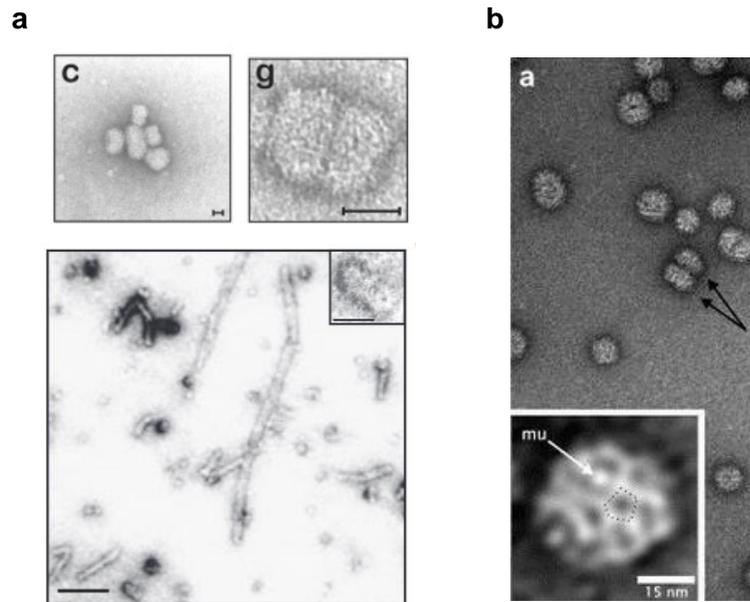


Figure 37 | Les différents états d'oligomérisation des protéines Vip1 et PspA.

Vip1 (a) et PspA (b) observées par microscopie électronique (C. Liu et al., 2007; Standar et al., 2008).

Grâce aux différentes régions de la protéine, les structures peuvent donc s'assembler et se désassembler. Ceci sous-entend que ces différentes régions hélicoïdales sont plus ou moins accessibles et que le phénomène d'assemblage et de désassemblage est exécuté par des chaperonnes.

Bien que ces états d'oligomérisation n'aient pas été mis en évidence chez BacB, sa capacité à former des oligomères n'est pas exclue compte tenu de sa structure homologue à PspA et Vip1. En effet, BacB contient la région coiled-coil formée par le surenroulement des hélices, indispensable pour l'oligomérisation. Si ces structures sont bien formées par BacB, l'action d'une protéine chaperonne est requise pour transporter et conserver le repliement des multiples copies de BacB. Cette hypothèse est cohérente avec la présence de BacA, située juste en amont de BacB, et possédant un double rôle de régulateur et de chaperonne.

III.2 Les protéines BacC et BacD, un nouveau couple NfeD/SPFH ?

III.2.1 La protéine BacC

D'après la base de données Pseudomonas Genome Database, la protéine BacC codée par le gène *PA14_16160*, possède une masse de 23,2 kDa et est constituée de 213 acides aminés. Sur la base de données Uniprot, BacC est annotée comme une « DUF1449 family protein ». Cette annotation est à l'état « unreviewed ».

La protéine BacC serait localisée dans la membrane interne (indice de confiance de 10/10). Selon Phobius, elle contiendrait 3 domaines transmembranaires (probabilité de 1/1), ce qui est

compatible avec cette prédiction de localisation membranaire. Une alternance de régions extra-cytoplasmiques et cytoplasmiques est aussi prédite (indice de confiance de 0,9/1). Ainsi, les extrémités N- et C- terminales se situeraient respectivement dans le périplasma et dans le cytoplasme. Les mêmes résultats sont obtenus avec le logiciel DeepTMHMM. Le détail de ces prédictions est disponible en annexe 3.

La base de données Interpro n'a malheureusement prédit aucun domaine fonctionnel. Grâce à l'utilisation d'une autre base de données, appelée HMMER (méthode du modèle de Markov caché), un domaine DUF1449 (en rose, Pfam : PF07290) a pu être identifié. Le domaine DUF1449, n'existe plus sur Interpro ce qui pourrait expliquer l'absence de prédiction. En revanche, l'accèsion Pfam fonctionne toujours et renvoie vers une annotation nommée « OB-fold protein ». Enfin, les trois domaines transmembranaires, servant d'ancrage à la membrane, sont une nouvelle fois identifiés (en violet) (**Figure 38**).

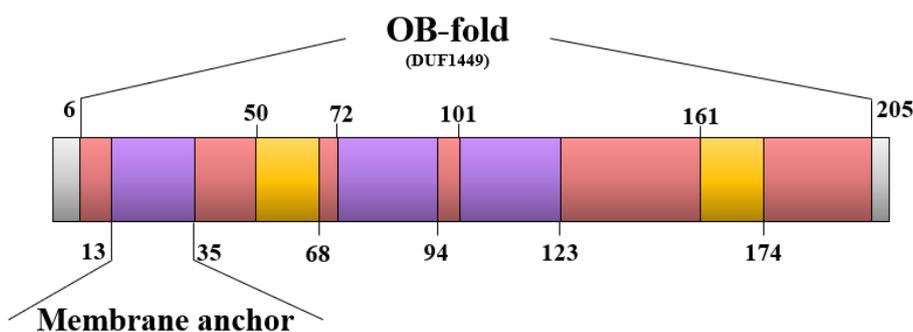


Figure 38 | BacC est une protéine transmembranaire.

Domaine fonctionnel identifié par HMMER, le domaine DUF1449 porte maintenant le nom de « OB-fold » dans la base de données Interpro.

D'après une recherche par mot-clé, il existe actuellement environ 3 000 protéines annotées « OB-fold protein » dans la base de données Interpro et parmi elles, une seule est à l'état « reviewed ». C'est la protéine YqiJ d'*E. coli* K12.

La protéine YqiJ, de 23 kDa, est elle aussi localisée dans la membrane interne. Elle possède 209 acides aminés et trois domaines transmembranaires. Les extrémités N- et C- terminales étant respectivement dans le cytoplasme et dans le périplasma (Daley et al., 2005).

La protéine YqiJ est connue en tant que membre de la famille des « NfeD homologues », NfeD pour « nodulation formation efficiency D ». Les protéines NfeD homologues discutées ici n'ont aucun lien avec la protéine NfeD originale découverte en 1994 chez *Rhizobium meliloti* (Soto et al., 1994). En réalité, une erreur d'annotation fonctionnelle est arrivée avec l'accèsion Pfam PF01957 sur une séquence et du fait d'une classification automatique, c'est tout un groupe de séquences qui a reçu cette annotation erronée. Malgré des tentatives de corrections, le terme

NfeD est maintenant couramment utilisé dans la littérature et dans les bases de données (Green et al., 2004).

Les membres de la famille NfeD homologues ont été découverts dans le cadre d'études phylogénétiques concernant les protéines SPFH (stomatin prohibitin flotillin HflK/C). Ces protéines SPFH sont très bien étudiées chez les eucaryotes mais leur présence chez les procaryotes commence tout juste à être mise en évidence grâce à la phylogénie. Ces études ont démontré que : *i*) le gène codant pour la protéine SPFH était, le plus souvent, en opéron avec un autre gène codant une protéine de fonction inconnue annotée NfeD et *ii*) les membres de la famille NfeD homologues sont nombreux chez les procaryotes mais absents chez les eucaryotes. Ces deux découvertes ont donné naissance à la famille « NfeD homologues » qui contient toutes les protéines en opéron avec une protéine SPFH. Le gène *yqiJ* d'*E. coli* ne déroge pas à cette règle car il est lui aussi en opéron avec *yqiK* qui code une protéine SPFH. D'après la phylogénie, l'ancêtre commun des membres de la famille NfeD homologues et des protéines SPFH est une archée nommée *Pyrococcus horikoshii*. Au sein des procaryotes les gènes codant les protéines NfeD et SPFH ont co-évolué expliquant leur diversité et leur lien étroit. En revanche, la protéine SPFH fût la seule à évoluer vers les eucaryotes.

Aujourd'hui, peu d'information quant à la fonction des membres NfeD homologues sont disponibles dans la littérature. Les membres les plus connus étant YqiJ d'*E. coli*, YuaF et YqeZ de *B. subtilis*, PH1510 et PH0741 de *P. horikoshii*.

La première protéine NfeD mise en évidence est la protéine membranaire thermostable PH1510 de *P. horikoshii* (Yokoyama & Matsui, 2005). Bien qu'elle ne partage que seulement 15% d'identité avec la protéase ClpP d'*E. coli*, elle possède elle aussi une activité sérine-protéase grâce à son domaine ClpP. La protéine PH1510, clive préférentiellement les régions hydrophobes enrichies en lysine. L'un de ses substrats est d'ailleurs sa voisine opéronique, la protéine SPFH PH1511. Les auteurs supposent que le clivage de la région C-terminale de PH1511 permettrait la formation d'un canal ionique (Yokoyama & Matsui, 2005). L'extrémité N-terminale, soit le domaine ClpP, de PH1510, sera élucidée un an plus tard, et confirmera bien son homologie avec la protéine ClpP (Yokoyama et al., 2006). La seconde NfeD de cette archée est PH0741, en opéron avec la protéine SPFH PH0740, les deux étant de fonctions inconnues.

La protéine YqeZ possède elle aussi un domaine ClpP et donc une activité enzymatique de type protéase. La délétion de *yqeZ* augmente la sensibilité de *B. subtilis* à la sublancine, un glycopeptide antimicrobien (Butcher & Helmann, 2006). Le gène *yqeZ* fait partie de l'opéron formé par les gènes *yqfA* et *yqfB*. YqfA est une protéine SPFH tandis que YqfB est de fonction inconnue (Shen et al., 2005). À ce jour, la structure de YqeZ est encore inconnue.

Concernant YqiJ et YuaF, elles semblent toutes les deux impliquées dans la conservation de l'intégrité membranaire (Bateman et al., 2004). Chez la souche K12, l'abondance de YqiJ est significativement augmentée en réponse aux dommages à l'ADN dus à un stress ou à une erreur de la machinerie de transcription (Khil & Camerini-Otero, 2002). Récemment, son implication dans la conservation de l'intégrité de la membrane durant un choc à l'acide lactique a été mise en évidence chez la souche O157:H7 (Lan & Shi, 2022). YuaF a été identifiée comme une protéine de réponse aux stress osmotique, éthanoïque et de température (Petersohn et al., 2001). Elle contribue aussi à la résistance de *B. subtilis* face à la céfuroxime, un antibiotique de la famille des β -lactames (Y. H. Lee et al., 2012). YuaF fait partie de l'opéron *yuaFGI*, où YuaG est une protéine SPFH et YuaI est de fonction inconnue (Y. H. Lee et al., 2012).

Les découvertes successives faites par les études fonctionnelles et phylogénétiques ont dessiné quatre sous-familles. La sous-famille NfeD1a (PH0741) qui a, par évolution, donné la sous-famille NfeD1b (PH1511 et YqeZ) et la sous-famille NfeD2a (YuaF). Cette dernière a ensuite formé la sous-famille NfeD2b (YqiJ). Les membres de la sous-famille NfeD1b possèdent une activité enzymatique grâce à leur domaine ClpP. Les membres des sous-familles NfeD1a et NfeD2a/b n'ayant pas de domaine ClpP ne possèdent pas d'activité enzymatique.

BacC possédant la même annotation que YqiJ, nous avons supposé qu'elle pourrait être un membre de la famille NfeD homologues. Pour confirmer cette hypothèse, un alignement a été réalisé avec d'autres membres NfeD. Comme aucun domaine ClpP n'a été identifié chez BacC, nous avons réalisé cet alignement uniquement avec les membres de la sous-famille NfeD1a et NfeD2a/b soit PH0741, YuaF et YqiJ.

D'après la **Figure 39**, nous observons quelques résidus conservés au sein des séquences. La majorité des résidus ont un pourcentage de conservation inférieur ou égal à 30%. Les pourcentages d'identité de séquence entre BacC/YqiJ et BacC/YuaF sont respectivement de 22,45% et 22,78% démontrant une faible homologie de séquence entre ces protéines. Le pourcentage d'identité de séquence entre YuaF et YqiJ, membres connus de la sous-famille NfeD2 n'est pas plus élevé car il n'est que de 23,75%.

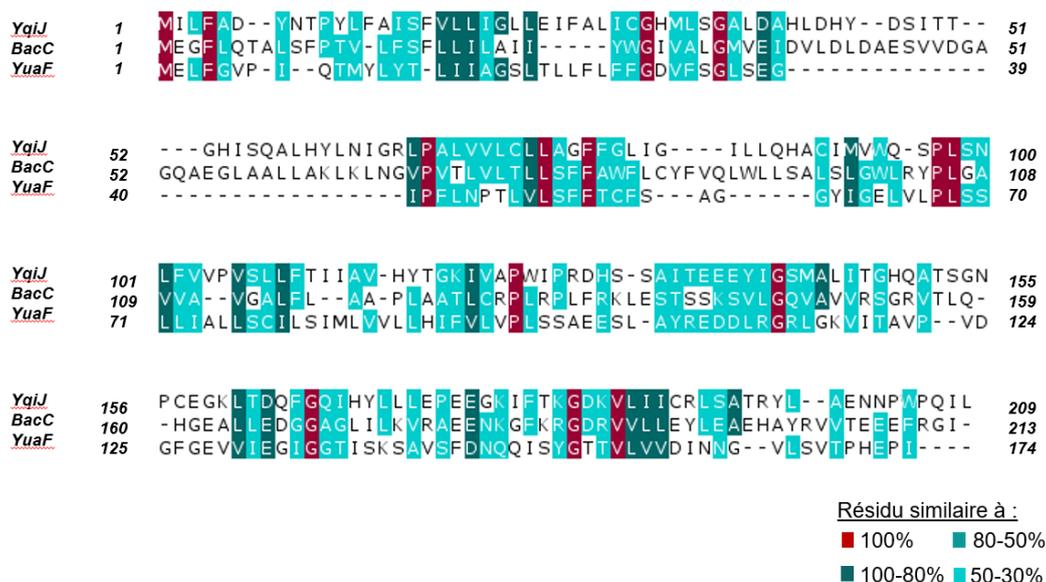


Figure 39 | BacC partage une faible homologie de séquence avec les NfeD homologues de la sous-famille NfeD2.

Alignement réalisé avec Clustal Omega et modifié à l'aide de Jalview. Les résidus sont coloriés selon leur pourcentage d'identité (option BLOSUM62 score).

Les structures secondaires et tertiaires de BacC ont ensuite été prédites puis comparées à celles des protéines NfeD. Il existe à ce jour seulement trois protéines NfeD dont la structure est partiellement ou entièrement élucidée : l'extrémité C-terminale de PH0741 (accession PDB 2EXD ; (Kuwahara et al., 2008)) et la protéine PH1510 (accessions PDB 3WWV et 2DEO ; (Yokoyama et al., 2006; Yokoyama & Matsui, 2014)) de *Pyrococcus horikoshii* et l'extrémité C-terminale de YuaF de *B. subtilis* (accession PDB 2K14 ; (Walker et al., 2008)).

En sachant que BacC ne présente pas d'activité protéase au niveau de son extrémité N-terminale, la comparaison s'est effectuée avec les extrémités C-terminales de PH0741 et YuaF.

Un premier essai de modélisation a été effectué avec le logiciel Swiss-Model mais aucun template n'a été trouvé par le logiciel. Ceci peut s'expliquer par le manque de données structurales concernant les protéines NfeD homologues. C'est donc le modèle prédit par AlphaFold qui a été utilisé. Enfin, BacC faisant partie de la même famille que YqiJ, leurs structures tertiaires ont aussi été comparées. La protéine YqiJ, n'ayant pas de structure élucidée, c'est son modèle prédit par AlphaFold qui a été utilisé.

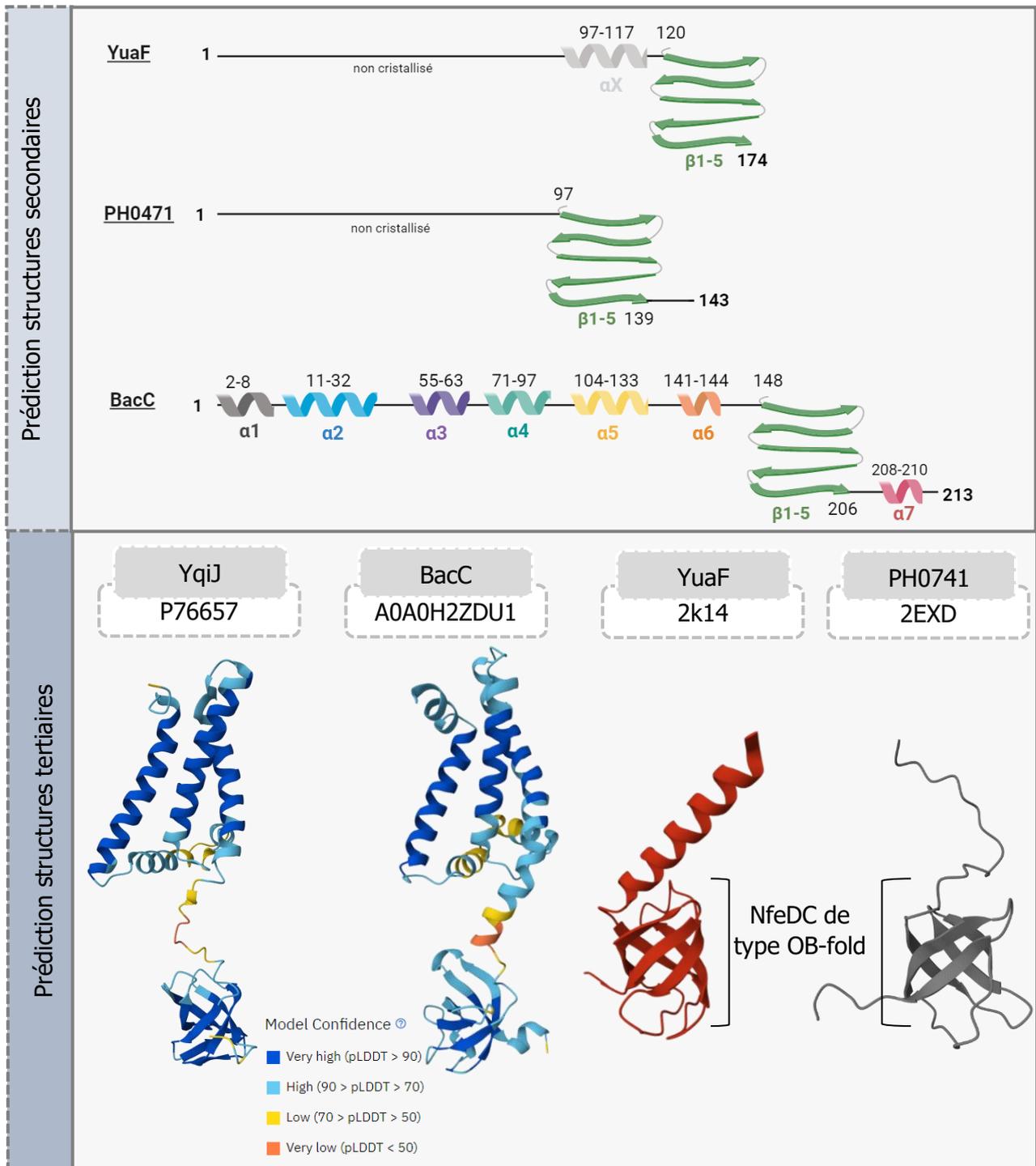


Figure 40 | La protéine BacC semble être un homologue structural des protéines NfeD.

Les structures de YuaF et de PH0740 ont été récupérées dans la base de données PDB selon leur accession indiquée dans la figure. Les figures ont été modifiées grâce au logiciel Mol*(MolStar). Les structures prédites de YqiJ et BacC proviennent de AlphaFold. Les extrémités N-terminales de YuaF et PH0471 ne sont pas représentées par manque de données cristallographiques.

D'après la **Figure 40** (rectangle du haut), une succession d'hélices α compose l'extrémité N-terminale de BacC tandis que son extrémité C-terminale est formée principalement de 5 brins- β formant une structure comparable à un mini tonneau bêta. Cette structure formée par 5 brins- β est aussi retrouvée dans l'extrémité C-terminale de PH0741 et YuaF. L'extrémité N-terminale de PH0741 et YuaF n'étant pas élucidée, aucune comparaison ne peut être effectuée avec BacC. En revanche, sachant que PH0741 et YuaF sont des protéines transmembranaires, il est fort probable qu'elles contiennent elles aussi, des hélices α leur permettant de s'ancrer à la membrane.

Concernant le modèle AlphaFold de BacC (**Figure 40**, rectangle du bas), une grande majorité des résidus est modélisée avec un score de confiance allant de fort à très fort, indiquant que le modèle est de bonne qualité. Seule la partie reliant les hélices α au feuillet- β manque de résolution et possède un score de confiance faible, à très faible, selon les résidus. Il en est de même pour le modèle AlphaFold de YqiJ. YqiJ est composée d'une succession d'hélices ce qui est cohérent avec la présence de ces trois domaines transmembranaires. Les protéines YqiJ et BacC partagent une structure tertiaire très similaire renforçant ainsi l'hypothèse que BacC appartiendrait la même famille que YqiJ.

En comparant l'ensemble de ces structures, un point commun apparaît clairement entre toutes ces protéines : l'extrémité C-terminale en feuillet- β . Ce feuillet- β a été mis en évidence par les différentes études structurales et adopte une conformation de type OB-fold. Le domaine OB-fold pour « oligonucléotide/oligosaccharide binding site » a été décrit pour la première fois par Murzin et ses collaborateurs chez les bactéries et les levures (Murzin, 1993). Les auteurs ont observé un motif commun chez ces 4 protéines capables de se fixer aux oligonucléotides ou aux oligosaccharides. Ce motif, dénommé OB-fold par les auteurs, est constitué de 5 brins- β formant un mini tonneau bêta compact. Ces 4 protéines ne possèdent aucune homologie de séquence mais leur domaine OB-fold est superposable. Par la suite, des interactions protéines-protéines par le biais de ce domaine ont été mises en évidence (Agrawal & Kishan, 2003; Arcus, 2002; Theobald et al., 2003).

L'étude structurale menée sur l'extrémité C-terminale de PH0741 a mis en évidence une conformation similaire au domaine OB-fold. L'extrémité C-terminale est composée de 5 brins- β formant un mini tonneau bêta mobile et reliée aux domaines transmembranaires par un linker peptidique flexible. En revanche, l'hélice α et les résidus aromatiques participant à la fixation du domaine OB-fold aux nucléotides sont absents chez PH0741. Ceci suggère que les protéines NfeD ne sont pas des protéines se fixant en nucléotides (Kuwahara et al., 2008).

Ces différences notables ont conduit les auteurs à nommer cette nouvelle conformation « domaine NfeDC » (**Figure 40**, rectangle du bas) (Kuwahara et al., 2008).

La même année, soit en 2008, les mêmes conclusions ont été émises lors de l'étude structurale menée sur YuaF. Cette protéine ne partage que 21% d'identité de séquence avec PH0741 mais son extrémité C-terminale est aussi de type OB-fold et superposable à celle de PH0741 (Walker et al., 2008). Ceci suggère que cette conformation est conservée au sein de la famille NfeD homologues. C'est d'ailleurs ce domaine NfeDC qui différencie les protéines des sous-familles NfeD2a/b de la sous-famille NfeD1a. Les membres de la sous-famille NfeD1a ont un domaine NfeDC plus long que les membres des sous-familles NfeD2a/b.

Cette conformation de type OB-fold est aussi présente chez BacC, laissant supposer qu'elle pourrait posséder un domaine NfeDC et ainsi être un nouveau membre de la famille NfeD homologues.

En plus de son extrémité C-terminale de type OB-fold, BacC possède un second point commun avec les protéines NfeD homologues. En effet, ces dernières possèdent des domaines transmembranaires, formés par les hélices α situées dans l'extrémité N-terminale. Ces hélices α exposent vers l'extérieur les résidus de nature hydrophobe permettant l'ancrage de la protéine à la membrane (**Figure 41**).

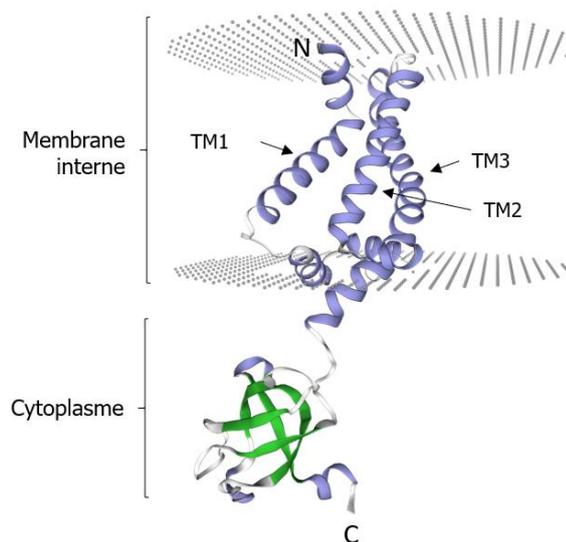


Figure 41 | Ancrage de la protéine BacC à la membrane grâce à ces trois domaines transmembranaires.

La protéine est colorée selon les structures secondaires qui la composent, en vert les brins- β et en violet les hélices α . TM : transmembranaire.

Les protéines NfeD homologues étant toutes membranaires, il est supposé que leur domaine NfeDC pourrait interagir soit avec leur partenaire SPFH soit avec une autre protéine membranaire voisine. Pour le moment, la seule interaction observée est celle entre PH1510 et sa partenaire SPFH PH1511.

En conclusion, la protéine membranaire BacC présente les caractéristiques communes aux protéines NfeD homologues : *i)* une partie transmembranaire en N-terminal et *ii)* une conformation de type OB-fold en C-terminal. BacC, n'ayant pas de domaine ClpP, ne possède pas d'activité protéase, il est donc peu probable qu'elle appartienne à la sous-famille NfeD1b. Elle se rapproche donc plus des protéines YuaF et YqiJ constituant les sous-familles NfeD2a/b. Au regard des rôles connus de YuaF et YqiJ au sein de la membrane, BacC pourrait, elle aussi, être impliquée dans la conservation de l'intégrité membranaire.

Comme mentionné plus haut, le gène codant une protéine NfeD est en opéron avec un gène codant une protéine SPFH. Ainsi, si BacC est bien une protéine NfeD, nous devrions identifier une protéine SPFH dans le système BAC.

III.2.2 La protéine BacD

Selon la base de données Pseudomonas Genome Database, la protéine BacD codée par le gène *PA14_16180*, affiche une masse de 75,8 kDa et possède 688 acides aminés.

Sur Uniprot, BacD est annotée en tant que « flotillin family protein » mais là encore cette annotation est à l'état « unreviewed ».

La localisation de BacD est incertaine. Elle serait localisée dans la membrane interne (indice de confiance de 7,88/10). Selon Phobius, BacD est exclusivement non cytoplasmique (indice de confiance de 0,9 /1). En revanche, deux prédictions supplémentaires se chevauchent : elle posséderait entre l'acide aminé 1 et 29, soit un peptide signal (indice de confiance de 0,8/1), soit un domaine transmembranaire (indice de confiance de 0,2/1). Le logiciel DeepTMHMM prédit, quant à lui, uniquement un domaine transmembranaire (probabilité de 1/1). La confusion entre peptide signal et domaine transmembranaire est récurrente avec les logiciels de prédiction.

En effet, le peptide signal et le domaine transmembranaire possèdent des caractéristiques biochimiques très proches, les rendant difficiles à distinguer. Le logiciel SignalP (version 5.0), spécialisé dans la prédiction de peptide signal, indique que BacD ne contient aucun peptide signal. Le peptide signal vise à adresser la protéine à la membrane en vue de sa sécrétion, or BacD n'est pas prédite comme étant sécrétée. Il est donc plus probable qu'elle contienne un domaine d'ancrage à la membrane. Le détail de ces prédictions est disponible en annexe 4.

D'après les prédictions, BacD contient un domaine « Band7/SPFH » (Figure 42, en vert, IPR036013) et un domaine « flotillin » (en marron, IPR027705). Entre les deux, on observe une succession de région coiled-coil (en orange). Enfin, nous retrouvons le domaine transmembranaire situé en début de séquence (en violet).

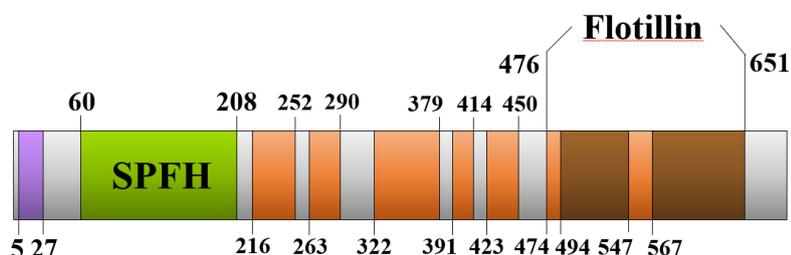


Figure 42 | BacD est une protéine membranaire de la famille des protéines SPFH.
Domaines fonctionnels identifiés par la base de données Interpro.

Une recherche par mot clé donne environ 175 000 protéines annotées « Band7/SPFH », dont 164 reviewed. Environ 22 000 protéines sont annotées « Flotillin » dont 31 reviewed. Parmi les protéines appartenant à une espèce bactérienne, seules 2 portent ces deux annotations : FloT (flotillin-like protein) de *B. subtilis* (souche 168) et YqiK (flotillin family inner membrane protein) d'*E.coli* (souche K12).

Les protéines SPFH et en particulier la protéine YqiK et FloT (aussi nommée YuaG) ont été légèrement abordées lors de l'étude bio-informatique de BacC. La protéine YqiK de 553 acides aminés, est codé par l'opéron *yqiJF* et possède une masse de 60,70 kDa. La protéine FloT de 509 acides aminés, est codée par l'opéron *yuaFGI* et fait 55,99 kDa.

Les protéines SPFH ont fait l'objet de très nombreuses études chez les eucaryotes. Plusieurs membres composent la famille des protéines SPFH incluant les stomatines, les prohibitines, les flotillines (appelées aussi Reggie), la podocine et les erlines. Ces protéines sont retrouvées exclusivement dans ou en interaction avec la membrane cytoplasmique, de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou du réticulum endoplasmique. Les deux protéines SPFH eucaryotes les plus étudiées sont les prohibitines et la stomatine. La prohibitine-1 et -2 (PHB1 et PHB2) sont présentes dans la membrane du noyau, du cytosol mais c'est dans la membrane de la mitochondrie qu'elles sont les plus abondantes et cruciales pour son fonctionnement. PHB1 et PHB2 s'assemblent et forment des structures en échafaudage impliquées dans la régulation du métabolisme de la mitochondrie comme sa biogénèse ou son autophagie. La stomatine-like 2 (SLP2), est aussi située dans la membrane des mitochondries, et est un acteur majeur dans l'assemblage de la chaîne respiratoire et dans la biogénèse de la mitochondrie (Christie et al., 2011; Mitsopoulos et al., 2015, 2017; Wai et al., 2016). D'autres fonctions comme la

transduction de signal, la mécanosensation et le transport d'ions ont aussi été associées aux protéines SPFH eucaryotes, en particulier la stomatine (Chowdhury et al., 2014; M. Huang et al., 1995; Klipp et al., 2020; Wetzel et al., 2007). Les flotillines-1 et -2 sont beaucoup plus spécialisées. Elles sont distribuées dans tous les tissus et sont impliquées dans l'organisation des lipides au sein de la membrane afin de favoriser des processus cellulaires, tels que le transport ou le recrutement de protéines, la régénération des axones, la formation de plateformes dédiées à la transduction de signal, et la prolifération cellulaire (Babuke & Tikkanen, 2007; Morrow & Parton, 2005; Otto & Nichols, 2011; Stuermer, 2011; F. Zhao et al., 2011).

Une dérégulation des protéines SPFH a été observée dans les cancers rénaux ou thyroïdiens anormalement agressifs, les maladies rénales, cardiaques ou neurodégénératives et dans la maladie d' Alzheimer et de Parkinson (Bartolome et al., 2016; Bramkamp & Lopez, 2015; Michel & Bakovic, 2007; Signorile et al., 2019; W. Zhu et al., 2018).

Les études phylogénétiques ont montré que les protéines SPFH ont co-évoluées avec leur partenaire NfeD au sein des procaryotes à partir de l'ancêtre commun *P. horikoshii*. Ainsi, comme pour les protéines NfeD homologues, les protéines SPFH ont été classées en sous-famille grâce à la phylogénie. Au total, 12 sous-familles de protéines SPFH ont été discriminées dont certaines sont présentées, avec leur partenaire NfeD, **Figure 43**. La sous-famille la plus répandue est SPFH1 qui inclut les p-stomatines (ou stomatin-like). La seconde sous-famille SPFH2, est celle des p-flotillines (ou flotillin-like), protéines très largement répandues chez les procaryotes et fortement similaires aux flotillines eucaryotes. Les sous-familles SPFH3 et SPFH4 contiennent respectivement les protéines HfIK et HfIC et les p-prohibitines (prohibitin-like). Les gènes codant les membres des sous-familles SPFH1, SPFH2 et SPFH5 forment un opéron avec un gène codant pour leur partenaire protéique NfeD, tandis que les membres des sous-familles SPFH3 et SPFH4 sont en interaction avec la protéase FtsH. Ces 5 sous-familles représentent à elles seules 75% de l'ensemble des protéines SPFH procaryotes (Hinderhofer et al., 2009).

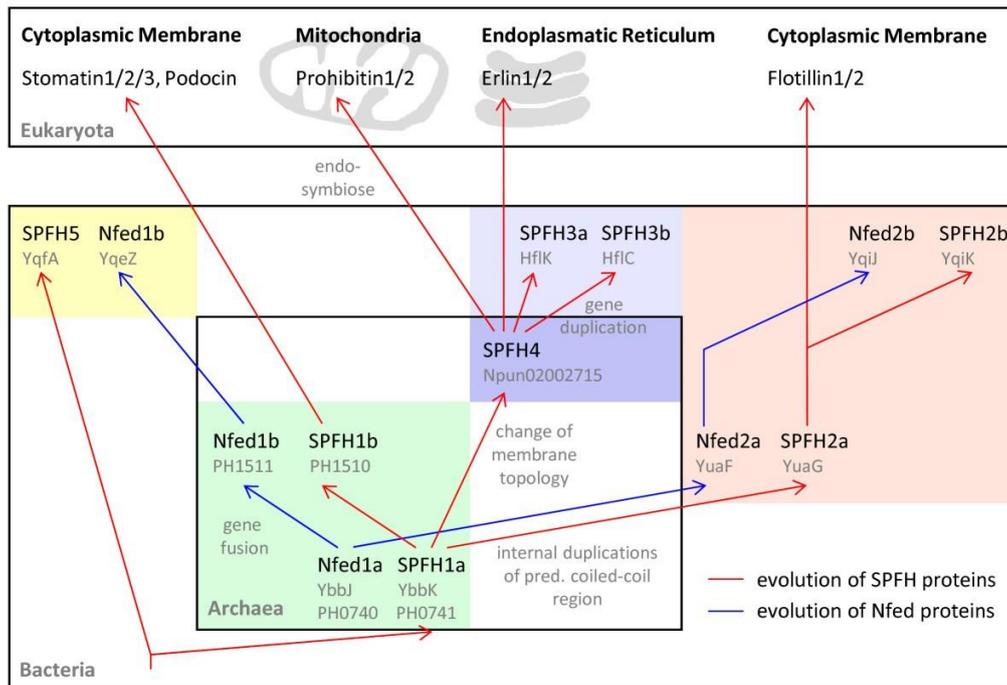


Figure 43 | Modèle de co-évolution entre les protéines NfeD et SPFH.

Ce modèle hypothétique se base sur la phylogénie et la structure des opérons (Hinderhofer et al., 2009).

D'après les précédentes prédictions de BacC, protéine NfeD appartenant à la famille des NfeD2, et le domaine fonctionnel « flotilline » identifié par Interpro, BacD appartiendrait à la sous-famille SPFH2 en tant que p-flotilline.

Pour approfondir cette hypothèse, un alignement a été réalisé avec les séquences protéiques d'autres membres appartenant à la sous-famille SPFH2 soit FloT et YqiK et avec les flotillines humaines FLOT1 et FLOT2.

Comme le montre la **Figure 44**, des acides aminés sont parfaitement conservés (en rouge 100% et vert foncé 80%) chez ces protéines. Ces acides aminés sont principalement des alanines (A) et des acides glutamiques (E). Ceci est cohérent avec la littérature. En effet, les p-flotillines possèdent un domaine flotilline riche en répétitions EA, responsables entre autres, de la formation de régions coiled-coil (Bickel et al., 1997; Hazarika et al., 1999; Lang et al., 1998; Schroeder et al., 1994; Schulte et al., 1997). Ces répétitions et les régions coiled-coil sont aussi présentes chez BacD confirmant l'hypothèse d'une p-flotilline.

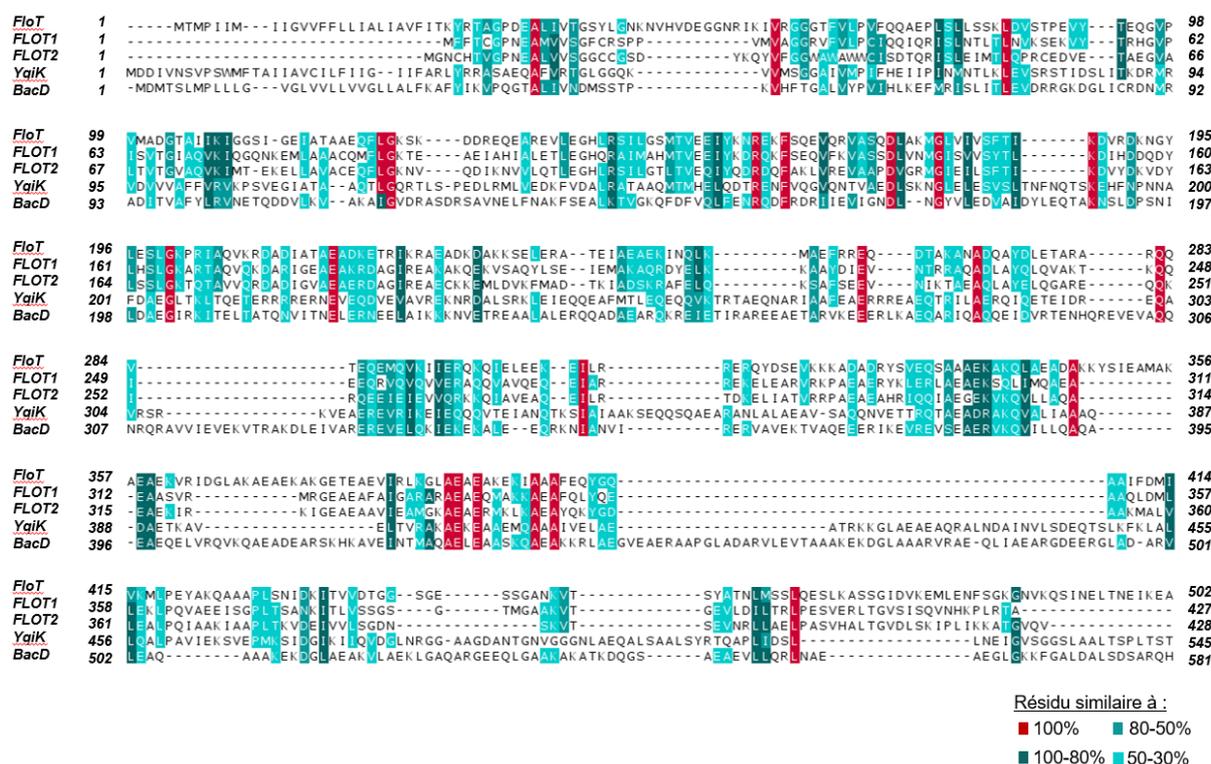


Figure 44 | BacD contient des répétitions EA caractéristiques des p-flotillines.

Alignement réalisé avec Clustal Omega et modifié à la main à l'aide de Jalview. Les résidus sont colorés selon leur pourcentage d'identité (option BLOSUM62 score).

BacD partage des pourcentages d'identité avec FLOT1 et FLOT2, de 20,51% et 20,30%, respectivement. Entre BacD et FloT, le pourcentage d'identité s'élève à 21,71%, tandis qu'il est de 30,06% avec YqiK. Le pourcentage d'identité le plus élevé concerne FloT et FLOT1 avec 40,85%. Les pourcentages d'identité entre YqiK et FLOT1 ou FLOT2 ne dépassent pas 21%.

Pour confirmer, l'hypothèse de BacD en tant que flotilline, les structures secondaires et tertiaires de BacD ont été prédites, puis comparées à celles des protéines SPFH.

Le domaine Band7/SPFH, situé en début de séquence, est présent chez toutes les protéines SPFH, qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes, indiquant sa forte conservation. Les études structurales menées sur les protéines SPFH, se sont donc majoritairement focalisées sur ce domaine, afin de confirmer l'appartenance de la protéine à la famille SPFH.

À ce jour, les structures de six protéines SPFH ont été entièrement ou partiellement élucidées. Chez les mammifères, l'extrémité N-terminale de FLOT2 de la souris (accession PDB 1WIN, (Prohaska & Salzer, 2018), la stomatine humaine (accession PDB 4FVJ ; (Brand et al., 2012)) et la major vault protein ou protéine de voûte majeure (MVP) du rat (accession PDB 7PKR ; (Guerra et al., 2022)) sont élucidées.

Chez les procaryotes, l'extrémité N-terminale des p-stomatines PH1511 et PH0740 de *P. horikoshii* qui sont disponibles (accession PDB 3BK6 ; (Yokoyama et al., 2008) et accession PDB 2RPB ; pas de référence bibliographique) sont disponibles. Récemment la structure des protéines SPFH HfIK et HfIC d'*E. coli* K12 ont été élucidées (accession PDB 7VHP ; (C. Ma et al., 2022) et accession PDB 7WI3 ; (Qiao et al., 2022)). Les structures de YqjK et FloT, sont encore inconnues.

Afin de comparer les structures tertiaires de ces protéines, un premier essai de modélisation a été effectué avec le logiciel Swiss-Model mais les scores des modèles proposés se sont avérés trop faibles. C'est donc le modèle prédit par AlphaFold qui a été utilisé (**Figure 45**). Une grande majorité des résidus de l'extrémité N-terminale, soit la partie que l'on souhaite comparer, est modélisée avec un score de confiance allant de fort à très fort. Seuls quelques résidus situés au centre et à l'extrémité C-terminale manquent de résolution et possèdent un score de confiance faible à très faible.

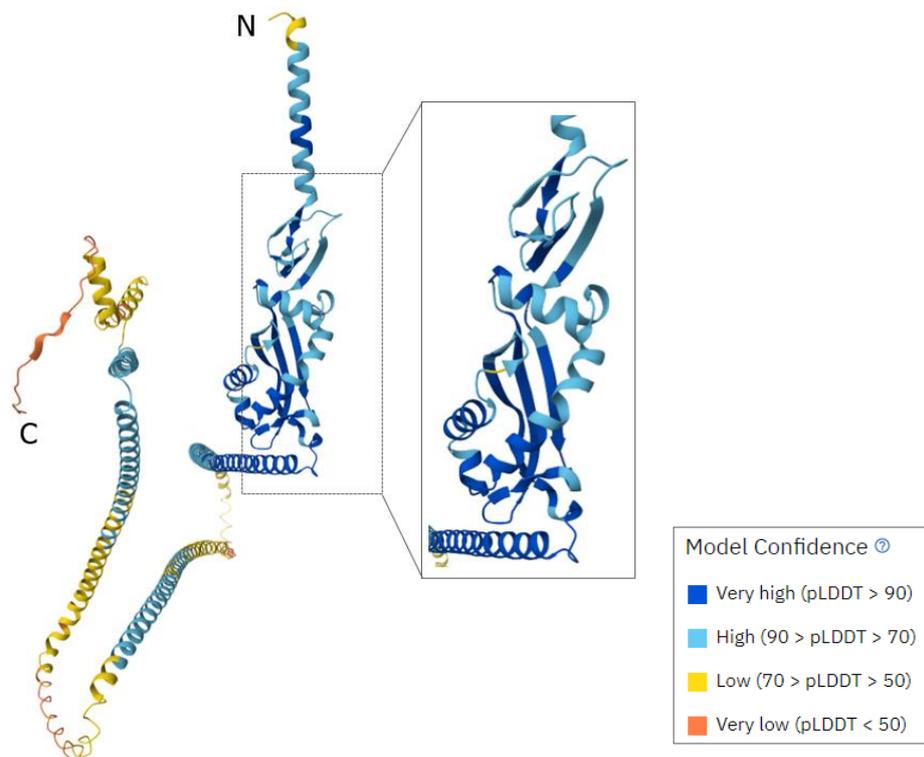


Figure 45 | Qualité du modèle de BacD prédit par AlphaFold.

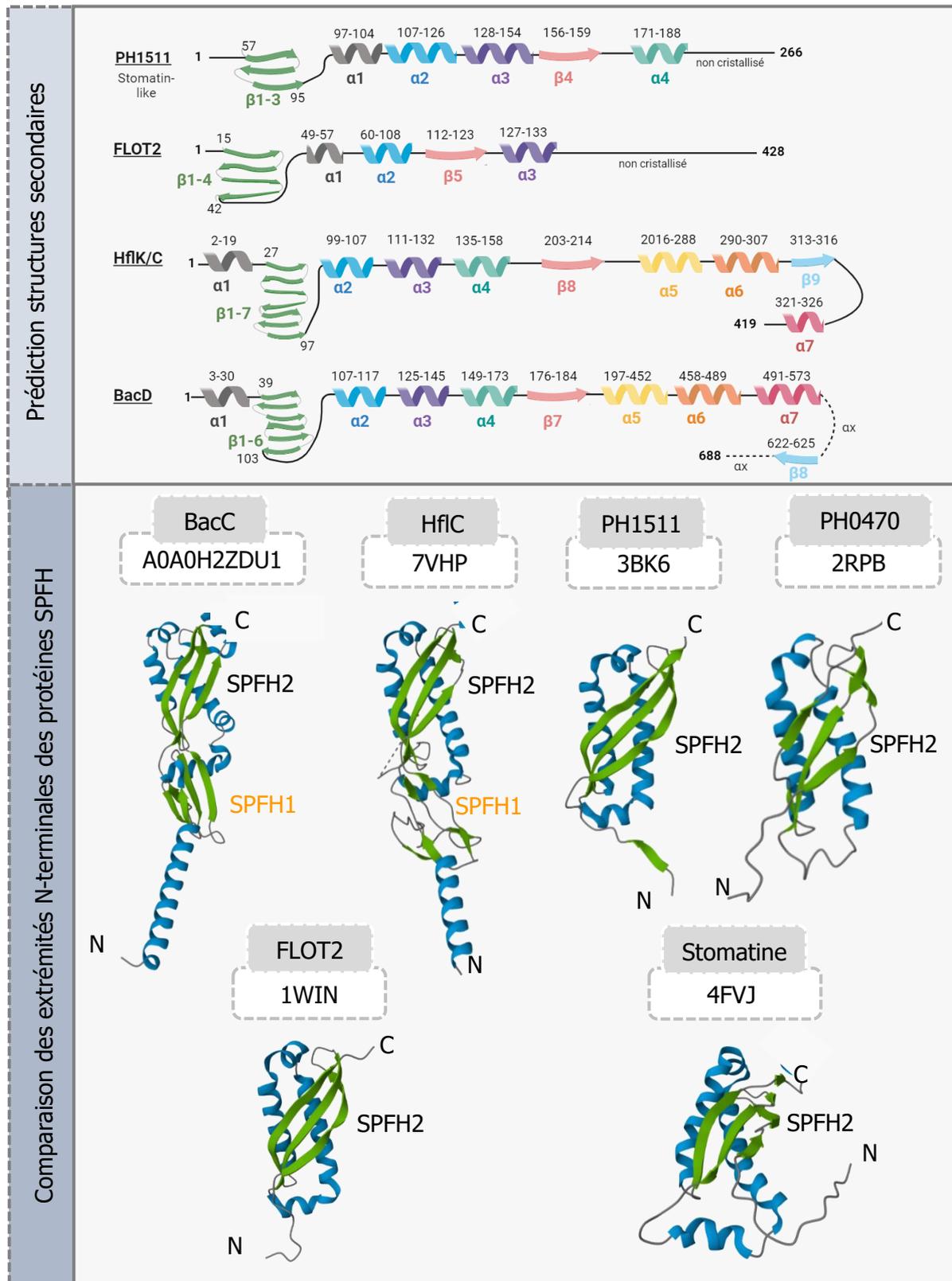


Figure 46 | Le domaine Band7/SPFH prédit chez BacD est superposable à celui des protéines SPFH.

Les structures ont été récupérées à partir des accès PDB de chacune des protéines indiquées sur la figure. Les traits en pointillés représentent une succession d'hélices, notée α_x , non schématisées (données disponibles en annexe 4). Les structures ont été modifiées à l'aide du logiciel Mol*(Star) en colorant les hélices α en bleues et les brins- β en verts.

Ces études ont mis en évidence la forte conservation structurale du domaine Band7/SPFH, noté SPFH2 sur la **Figure 46** (en orange). Ce domaine se compose de 4 hélices α et 3 brins- β . Ces structures sont observées chez BacD, confirmant ainsi la prédiction du domaine Band7/SPFH, et son appartenance à cette famille. Ces structures secondaires en hélice ont été identifiées par dichroïsme circulaire lors des travaux du Dr. Ben Mlouka (Ben Mlouka, 2014).

Bien qu'aucun domaine flotilline n'ait été élucidé, jusqu'à maintenant, il est prédit comme étant composé d'une succession d'hélices dont certaines impliquées dans la formation de région coiled-coil (Langhorst et al., 2005). La structure obtenue pour BacD est cohérente avec une forte proportion d'hélices dans son extrémité C-terminale.

Les protéines SPFH possèdent à leur extrémité N-terminale une hélice permettant leur insertion dans la membrane. Les flotillines font exception à cette règle, car elles ne possèdent pas d'hélice α en N-terminale. Ainsi leurs extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytoplasme. Cependant, elles s'associent à la membrane grâce au phénomène de lipidation de certains résidus de l'extrémité N-terminale (Gkantiragas et al., 2001; Morrow et al., 2002). BacD contient un domaine flotilline dans son extrémité C-terminale, mais semble différente d'une flotilline eucaryote. En effet, à la différence de FLOT2, BacD possède un domaine transmembranaire grâce à son hélice α en N-terminal. De plus, les structures secondaires et tertiaires de BacD sont fortement similaires à celles des protéines HflK/C (**Figure 46**).

Les protéines HflK et HflC sont deux SPFH extrêmement similaires. Elles possèdent toutes les deux un domaine transmembranaire à l'extrémité N-terminale, puis deux domaines SPFH notés SPFH1 et SPFH2 (**Figure 46**, dernier rectangle). La présence de deux domaines SPFH successifs n'avait encore jamais été mis en évidence sauf pour la protéine de voûte majeure qui contient 9 domaines SPFH (Guerra et al., 2022). Le domaine SPFH1 contient 5 brins- β antiparallèles insérés dans la couche lipidique externe de la membrane interne, grâce à des acides aminés aromatiques comme les phénylalanines (**Figure 46**). Le domaine SPFH2, composé de 4 hélices α et 3 brins- β correspond au domaine Band7/SPFH (**Figure 46**).

D'après nos prédictions, BacD posséderait, elle aussi une succession 5 brins- β antiparallèles qui pourrait correspondre au domaine SPFH1. Un autre point commun avec les protéines HflK et HflC concerne la localisation de ces protéines entièrement périplasmique (**Figure 47**).

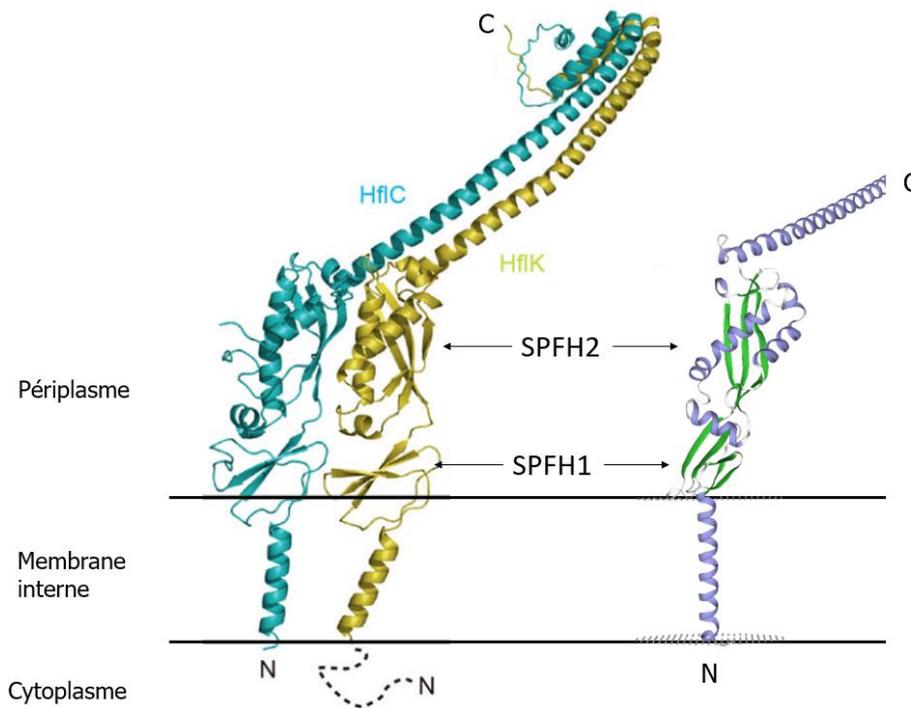


Figure 47 | Similarités de structure et de localisation entre l'hétérodimère HflK/C et BacD.

Le modèle de BacD est coloré selon les structure secondaires (en violet les hélices α et en vert les brins- β). Modifiée à partir de (Daumke & Lewin, 2022).

Les différentes études structurales menées sur les protéines SPFH ont révélé l'une des caractéristiques majeures de ces protéines : des propriétés d'oligomérisation exceptionnelles.

L'étude structurale la plus récente, datant de 2022, concerne les protéines HflK et HflC (C. Ma et al., 2022). Ces protéines forment un gigantesque complexe de 2,7 MDa avec la protéase FtsH, appelé le complexe KCF. En réalité, 12 copies du dimère HflK/C s'assemblent pour former une cage périplasmique ancrée dans le feuillet extérieur de la bicouche lipidique de la membrane interne (**Figure 48**).

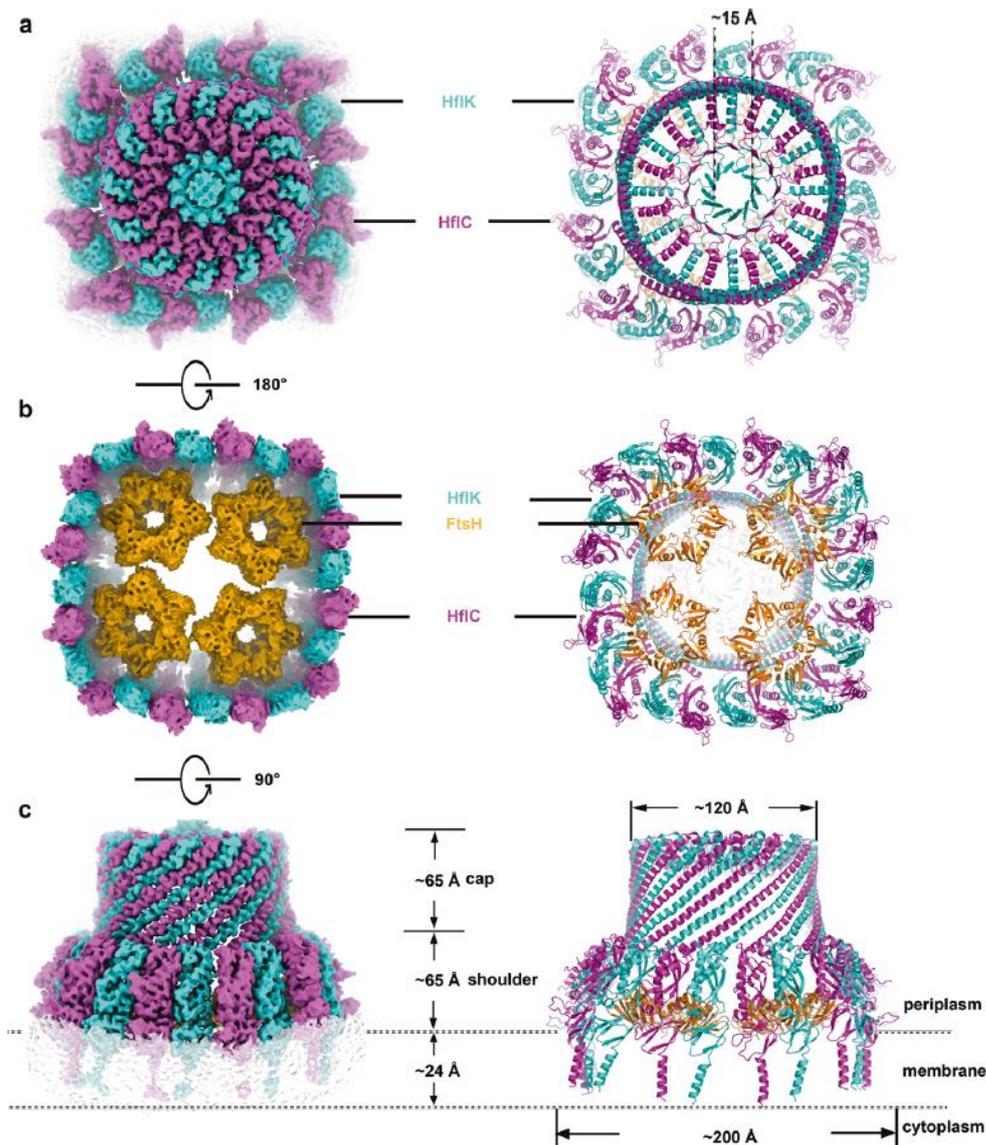


Figure 48 | La structure du complexe KFC.

Vue du dessus **(a)** en représentation cryo-microscopie électronique (à gauche) et atomique (à droite). Vue du dessous **(b)** en représentation cryo-microscopie électronique (à gauche) et atomique (à droite). Vue du côté **(c)** en représentation cryo-microscopie électronique (à gauche) et atomique (à droite). Les protéines HflK, HflC et FtsH sont colorées en cyan, magenta et orange, respectivement. (C. Ma et al., 2022).

Les 12 copies du dimère HflK/C s'alignent parfaitement, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, pour former une structure en forme de cage (**Figure 48a**). Au sein de cette cage, se trouvent, 4 hexamères de la protéine FtsH (**Figure 48b**). Ce complexe KFC est ancré à la membrane grâce aux 24 extrémités N-terminales en hélice α et domaines SPFH1, recouvrant environ 300 à 400 nm² de surface membranaire (**Figure 48c**). Ce complexe est stabilisé par plusieurs interactions complexes dont certaines se trouvent entre les différents brins- β du domaine SPFH1 de HflK et HflC. Du côté périplasmique, la cage est partiellement fermée par un chapeau ou « cap », grâce aux interactions hydrophobes entre les régions coiled-coil.

Enfin, un canal situé au centre de ce cap est formé par le dernier brin- β (le brins- β 9 sur la **Figure 48**) de HflK/C. Ce canal, constamment ouvert, permet l'accès des molécules au sein du complexe, appelé chambre, à partir de l'espace périplasmique.

Les protéines FtsH sont très conservées et sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes (mitochondries et chloroplastes) (Z. Adam et al., 2005; Tatsuta & Langer, 2009). Elles appartiennent à la super famille des AAA+ (ATPase Associated with diverse cellular activities). L'hexamère formé par les 6 copies de FtsH est ancré à la membrane interne par le biais des extrémités N-terminales tandis que les domaines de fixation à l'ATP et à activité protéase sont dans le cytoplasme (Suno et al., 2006). Les protéines FtsH, à la fois chaperonnes et protéases ont un rôle majeur dans le contrôle qualité du repliement des protéines membranaires et cytosoliques. Par le nombre et la diversité de leurs substrats, solubles ou membranaires, elles régulent de nombreux de processus cellulaires.

Chez *E. coli*, FtsH régule la réponse au choc chaud *via* la dégradation du facteur de transcription σ^{32} (RpoH) (Tomoyasu et al., 1995). Elle maintient aussi un ratio correct entre les LPS et les phospholipides *via* la dégradation de l'enzyme de synthèse du lipide A, la désacétylase LpxC (Ogura et al., 1999). Enfin, FtsH participe au bon fonctionnement du système de transport SecYEG en dégradant les formes non complexées de SecY, dangereuses pour l'homéostasie membranaire (Akiyama et al., 1996). Chez *P. aeruginosa*, les rôles de FtsH sont conservés en particulier dans le contrôle qualité du repliement des protéines et dans la dégradation des protéines non actives (Basta et al., 2020; Heywood & Lamont, 2020; Kamal et al., 2019). En revanche, le ratio LPS/phospholipide ne semble pas contrôlé par la protéase FtsH (Langklotz et al., 2011). Que ce soit chez *E. coli* ou *P. aeruginosa*, le gène codant la protéine FtsH fait partie des gènes régulés par le facteur de transcription σ^{32} (Tomoyasu et al., 1995; Williamson et al., 2023).

De nombreuses études ont mis en évidence une régulation de l'activité enzymatique de FtsH par les protéines HflK/C (Gehl & Sweetlove, 2014; Saikawa et al., 2004; Tavernarakis et al., 1999). Cependant, Ma et collaborateurs ont été les premiers à proposer une hypothèse quant au mécanisme de régulation (**Figure 49**).

Ainsi, d'après les auteurs, la formation du complexe KFC permettrait de réguler l'activité enzymatique de FtsH. Ce complexe limiterait l'accès de FtsH à ses substrats, en particulier membranaires, en la séquestrant au sein de la chambre. En effet, l'insertion du complexe au sein de la membrane rend la chambre totalement hermétique évitant ainsi que les protéines membranaires situées à proximité ne s'approchent de FtsH. Les fortes interactions entre les domaines SPFH1 rend la chambre, et par conséquent le feuillet lipidique externe situé à

l'intérieur, hermétiques à la diffusion des protéines. Ce complexe serait donc un « gardien » des protéines membranaires en leur évitant des phénomènes de protéolyse non désirés.

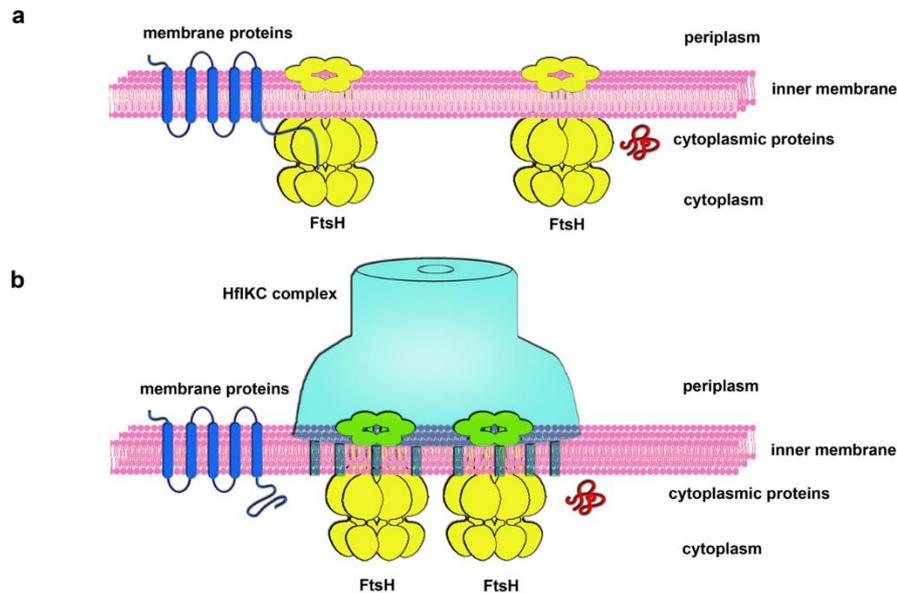


Figure 49 | Le rôle du complexe KFC dans la régulation du contrôle qualité des protéines par l'inhibition de l'activité protéase de FtsH.

L'hexamère FtsH dégrade les protéines mal repliées ou endommagées (a). Les protéines HflK et HflC forment le complexe circulaire inséré dans la membrane par les extrémités N-terminales (b). (C. Ma et al., 2022).

Ces auteurs suggèrent aussi que, étant donné la forte conservation structurale du domaine SPFH, toutes les protéines SPFH partageraient ces capacités d'oligomérisation selon un mécanisme de juxtaposition des sous-unités dans le but de former un complexe circulaire.

Cette hypothèse s'appuie sur les données structurales des autres protéines SPFH. La stomatine forme une structure en forme d'anneau grâce à l'assemblage de plusieurs dimères en forme de « banane » grâce aux interactions entre les brins- β du domaine Band7/SPFH (Brand et al., 2012). Ces structures en forme d'anneau ont aussi été observées chez la prohibitine de levure et la stomatine de cyanobactérie (Boehm et al., 2009; Tatsuta et al., 2005). La p-stomatine PH1511 se dimérise aussi en forme de « banane » mais est aussi capable de se trimériser (Komatsu et al., 2022; Yokoyama et al., 2008). Aujourd'hui, ces propriétés d'oligomérisation n'ont pas été mises en évidence chez les flotillines et les p-flotillines. En revanche, il est probable que, par l'intermédiaire des régions coiled-coil formées par la répétition des acides aminés EA, l'extrémité C-terminale soit impliquée dans la formation d'oligomères.

Concernant BacD, des propriétés d'oligomérisation et une activité canal par la technique de reconstitution en bicouches lipidiques, ont été mises en évidence (Ben Mlouka, 2014). De plus, un des modèles prédits par Swiss-Model se base sur le template de la superstructure formée

par les 39 copies de la protéine MVP (**Figure 50**). Le modèle de BacD, juxtapose aussi 39 copies pour former une structure cylindrique. En revanche, seule la partie correspondant aux 30 à 300 premiers acides aminés de BacD ont été modélisés, ce qui pourrait expliquer les faibles scores. Cependant, ce modèle est en accord avec la littérature et les propriétés d'oligomérisation observées expérimentalement.

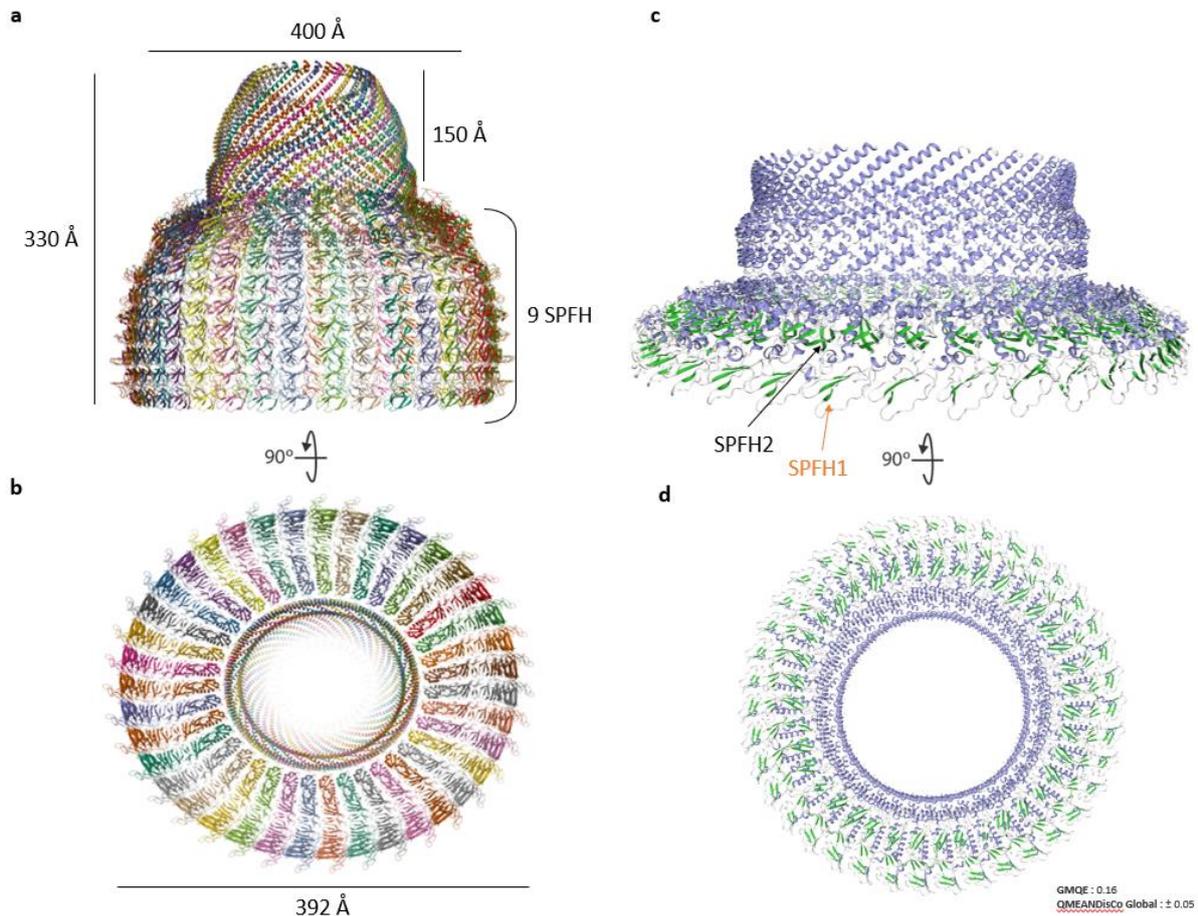


Figure 50 | Modèle structural hypothétique de BacD construit à partir du template de MVP.

Le complexe circulaire formé par les 39 copies de MVP vue de côté (**a**) et de dessous (**b**). Le modèle de BacD prédit par Swiss-Model, vue de côté (**c**) et de dessous (**d**). La structure du complexe MVP a été obtenue à partir de l'accèsion PDB 7PKR et les données structurales à partir de (Guerra et al., 2022). Le modèle de BacD est coloré selon les structures secondaires (en violet les hélices α et en vert les brins- β). Les domaines SPFH1 et SPFH2 identifiés précédemment sont indiqués par les flèches.

À ce jour, une seule étude a été consacrée à une protéine SPFH de *P. aeruginosa*. Cette étude phylogénétique fût d'ailleurs l'une des premières à s'intéresser à l'existence des protéines SPFH chez les procaryotes. Elle a, dans le même temps, mis en lumière l'existence d'un opéron avec un gène codant une protéine NfeD. Ainsi, le gène *pa0452* de *P. aeruginosa* code pour une p-stomatine et est en opéron avec *pa0451*, qui code une NfeD contenant un domaine ClpP. Enfin, la protéine PA3729 (l'homologue de BacD chez *P. aeruginosa* PAO1) et PA0452

n'ont été citées qu'une seule fois dans une revue, sans information supplémentaire (Bramkamp & Lopez, 2015).

La protéine membranaire BacD présente donc toutes les caractéristiques communes aux protéines SPFH : *i)* un domaine transmembranaire à son l'extrémité N-terminale, *ii)* un domaine Band/7SPFH formé par 4 hélices α et 3 brins- β , *iii)* un domaine « flotillin » en C-terminal, *iv)* une répétition d'acides aminés EA formant les régions coiled-coil, *v)* des propriétés d'oligomérisation et une activité canal et *vi)* *bacD* est en opéron avec *bacC*, qui code une NfeD homologue. La protéine BacD présente en particulier des similitudes avec HflK/C comme sa localisation exclusivement périplasmique et la présence d'un second domaine SPFH formé par 5 brins- β .

Les protéines BacC et BacD, pourraient par conséquent former un nouveau couple NfeD/SPFH.

III.3 La protéine BacE

D'après la base de données Pseudomonas Genome Database, la protéine BacE codée par le gène *PA14_16190*, affiche une masse de 197 kDa et est composée de 1746 acides aminés. Sur la base de données Uniprot, BacE est annotée comme une « AAA family ATPase ». Cette annotation est à l'état unreviewed.

D'après les prédictions de PSORTb, la protéine BacE est localisée dans la membrane interne avec un indice de confiance de 7,66 sur 10. Ceci est en accord avec la prédiction Phobius, qui désigne BacE comme entièrement non cytoplasmique (indice de confiance 1/1) sans pour autant détecter de domaine transmembranaire. À l'inverse, DeepTMHMM prédit BacE comme entièrement cytoplasmique (probabilité de 1/1) (annexe 5). Ces prédictions contradictoires ne permettent pas de conclure quant à la localisation de BacE.

BacE, contient un domaine « DUF3686 » (en rouge, IPR020958) et un domaine « ATPase_dynein-related, AAA » (en rose, IPR011704), séparés par une succession de régions coiled-coil (**Figure 51**).

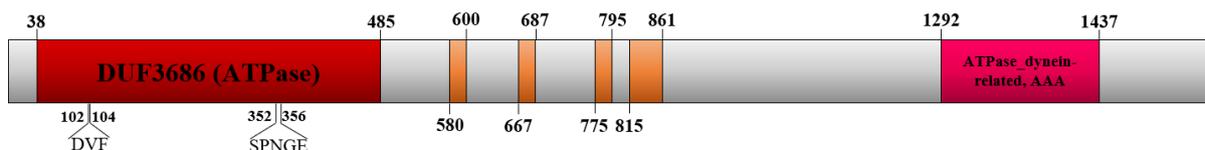


Figure 51 | BacE est une protéine de la famille des protéines ATPase AAA+. Domaines fonctionnels identifiés par la base de données Interpro.

Le domaine DUF3686, contient toutes les protéines associées à une activité ATPase et contenant deux motifs conservés : DVF et SPNGED (**Figure 51**). Environ 2 000 protéines contiennent ce domaine et toutes sont à l'état unreviewed.

La présence du domaine « ATPase_dynein-related, AAA » indique que BacE fait partie de la famille des ATPase AAA (ATPase associated to a variety of cellular activities). Environ 76 000 protéines contiennent ce domaine et seulement 49 sont à l'état reviewed. Un second domaine appelé « P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase (P-NTPase) » chevauche le domaine AAA (IPR027417, non représenté sur la figure).

La famille des ATPases AAA+ a été légèrement abordée avec la protéine FtsH, lors de l'étude bio-informatique de BacD. Les ATPases exploitent l'énergie contenue dans la molécule d'ATP pour mener à bien divers processus biologiques comme la fusion membranaire, la protéolyse, la réplication de l'ADN et le transport de protéine et de vésicules. Leur substrats sont donc nombreux et sont principalement des acides nucléiques et des protéines (Ogura & Wilkinson, 2001). Il existe plusieurs classes d'ATPases, la plus répandue étant celle des ATPases de type Walker qui sont caractérisées par un motif Walker A (ou P-loop) et Walker B. Ces deux motifs permettent notamment la fixation des ATPases sur les nucléotides triphosphates (c'est pourquoi elles possèdent aussi le nom générique de P-NTPase, ce qui explique le domaine P-NTPase prédit par Interpro).

Les ATPases AAA (initialement sans le +) sont une sous famille des ATPases de type Walker. Elles contiennent toutes un domaine conservé d'environ 200 à 250 résidus désigné sous le terme de module AAA ou de cassette AAA. La phylogénie a mené à la découverte d'autres membres présentant aussi un domaine AAA et des structures communes mais avec de nouveaux rôles dans les processus cellulaires, c'est pourquoi, le terme de superfamille AAA+ est apparu et est aujourd'hui couramment utilisé (Erzberger & Berger, 2006; Iyer et al., 2004). Ces nouveaux rôles concernent la réparation de l'ADN, la recombinaison, la transcription, le repliement/dépliement d'une protéine ou encore l'assemblage et le désassemblage de structures protéiques. Ce dernier rôle leur donne d'ailleurs le nom de « moteur AAA+ » dont le membre le plus connu est la dynéine impliquée dans le transport des chromosomes durant la mitose.

Au cours de l'évolution, des modules AAA ont fusionné et des domaines se sont rajoutés à ces modules créant ainsi une diversité fonctionnelle importante (Jessop et al., 2021). Ces domaines confèrent aussi la spécificité de l'ATPase AAA+ à un substrat (ou des substrats), modulent l'activité ATPase et permettent l'interaction avec des facteurs et des protéines accessoires.

À partir de ces organisations moléculaires, les ATPases AAA+ sont classées en quatre catégories (**Figure 52**).

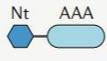
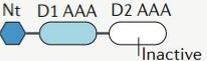
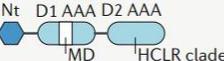
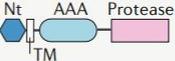
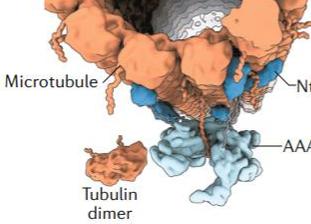
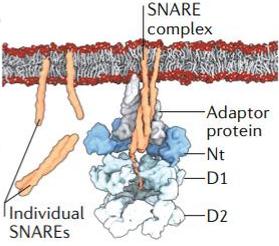
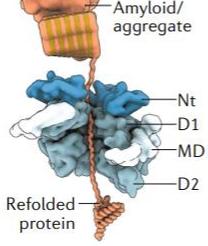
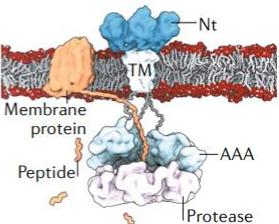
AAA+ protein	a Spastin	b NSF	c Hsp104	d YME1
Category	Type I AAA+ protein	Type II AAA+ protein	Type II AAA+ protein	AAA+ protease
Modular organization				
Molecular activity	Protein polymer disassembly	Protein complex disassembly	Protein disaggregation	Protein degradation
Biological function	Cytoskeleton remodelling	Synaptic vesicle fusion	Heat shock stress response	Mitochondrial protein quality control
				

Figure 52 | Organisation moléculaire des ATPases AAA+.

Représentation schématique de l'ATPase AAA+ de Type I la spastine (PDB 6P07) **(a)**, de l'ATPase AAA+ de Type II, la protéine senseur de N-éthylmaléimide (NSF, PDB 6MDO) **(b)** et la protéine de choc chaud Hsp104 (PDB 5VYA) **(c)**, la protéase AAA+ YME1 (PDB 6AZ0) **(d)**. Pour chaque AAA+, l'organisation moléculaire des domaines est représentée par un diagramme et l'activité moléculaire et les fonctions biologiques sont indiquées. Pour chaque illustration, les domaines sont colorés selon le diagramme et le substrat de chacune des AAA+ est représenté en orange : les polymères de tubuline (a), le complexe SNARE (b), les protéines amyloïdiques ou agrégées (c) et la protéine membranaire pour YME1 (d). AAA : domaine ATPase, D1 et D2 : domaines ATPase individuels 1 et 2, MD : domaine du milieu, Nt : N-terminal, TM : région transmembranaire (Puchades et al., 2020).

D'après Interpro, BacE ne posséderait qu'un seul domaine AAA laissant supposer qu'elle pourrait faire partie de la catégorie des ATPases AAA+ de type I. De manière générale, les ATPases AAA+, toutes catégories confondues, ont une extrémité N-terminale qui ne présente pas d'activité ATPase mais qui sert de site de reconnaissance aux substrats. Elle est donc responsable de la spécificité des substrats. L'activité ATPase médiée par le(s) domaine(s) AAA+ peut donc être spécifique au substrat reconnu et par conséquent posséder une fonction biologique précise (Monroe & Hill, 2016). C'est le cas des ATPases de type I. Chez les eucaryotes, les ATPases AAA+ de type I les plus connues sont la katanine, la fidgetine, la spastine et VPS4.

Grâce à la reconnaissance des polymères de tubulines par leur extrémité N-terminale, la katanine, la fidgetine et la spastine participent au remodelage du cytosquelette (Roll-Mecak & McNally, 2010; Roll-Mecak & Vale, 2008). L'extrémité N-terminale de VPS4 reconnaît le complexe ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport III), en particulier l'extrémité C-terminale. Cette reconnaissance induit un désassemblage de ESCRT-III (Lata et al., 2008; Scott et al., 2005).

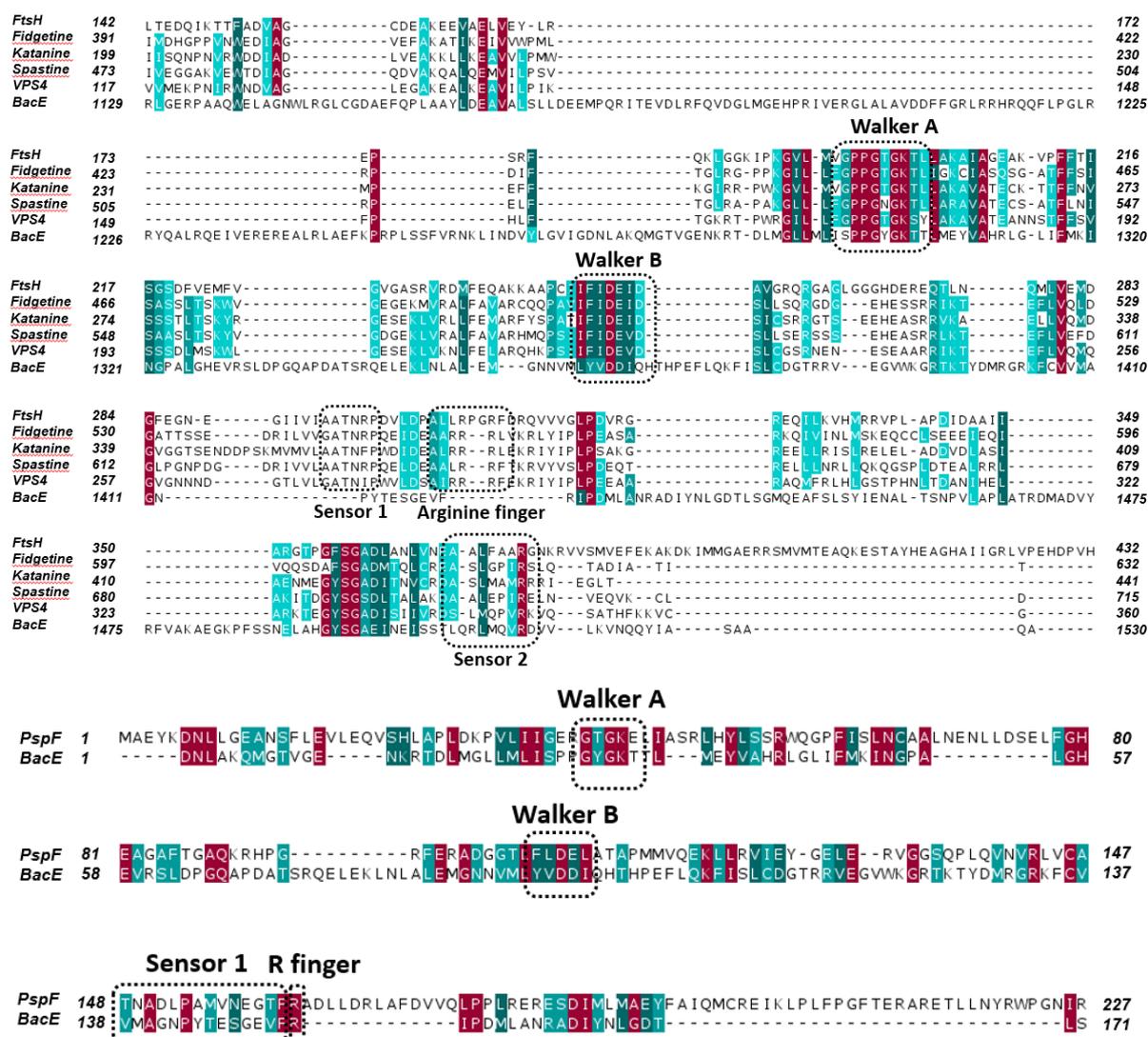
Ainsi, l'ajout de domaines, ici le domaine DUF3686, pourrait conférer la spécificité de substrats à BacE. D'après la prédiction et les annotations des 2 000 protéines portant cette annotation, les protéines DUF3686 aurait une activité ATPase impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. Dans la littérature, aucune donnée fonctionnelle et/ou structurale n'existe concernant le domaine DUF3686, ce qui empêche de confirmer cette hypothèse fonctionnelle.

La vérification de la prédiction de BacE en tant que membre de la superfamille des ATPases AAA+ se fera donc avec le domaine AAA. Ce domaine est commun à tous les membres de cette superfamille et contient plusieurs motifs conservés. Le motif Walker A, dont la séquence consensus G-XXXX-GK-T/S (où X est un résidu quelconque) contient une lysine très conservée. Le motif Walker B de séquence hhh-D-D/E-hh (où h est un résidu hydrophobe) contient un glutamate aussi très conservé. À la suite du Walker B se trouve une région appelée SRH (second region of homology) qui contient deux motifs, le sensor 1 (résidu TN en général) et l'arginine finger (résidu RR ou R). Le dernier motif, le senseur 2 contient un résidu R conservé (Hanson & Whiteheart, 2005).

Pour identifier ces différents motifs, un alignement entre les ATPases AAA+ de type I citées ci-dessus et BacE a été réalisée. Deux ATPases AAA+ procaryotes ont aussi été incorporées : FtsH une AAA+ protéase et PspF une ATPase AAA+ de type I. PspF est l'ATPase AAA+ du système Psp d'*E. coli* qui, en condition inductrice, active la transcription des gènes du système Psp.

À noter que le domaine protéase de FtsH, abordé lors de l'étude bio-informatique de BacD, ne sera pas pris en compte étant donné que BacE ne contient pas d'activité protéase connue.

D'après la **Figure 53**, BacE possède les motifs conservés Walker A, Walker B et le senseur 2. En revanche, les résidus du senseur 1 et de l'arginine finger ne sont pas identifiables. Lorsqu'on compare les séquences de BacE et PspF, BacE possède des résidus conservés qui correspondent au senseur 1 et à l'arginine finger.



Résidu similaire à :
■ 100% ■ 80-50%
■ 100-80% ■ 50-30%

Figure 53 | BacE contient les motifs conservés du domaine AAA.

Alignement réalisé avec Clustal Omega et modifié à l'aide de Jalview. Les résidus sont coloriés selon leur pourcentage de conservation (option BLOSUM62 score). Les différents motifs sont entourés en pointillés. En raison d'alignement erroné, l'alignement de BacE avec PspF a été réalisé en dehors des autres séquences. Pour réaliser l'alignement avec PspF, seuls les acides aminés allant de 1271 à 1460 (domaine AAA prédit) de BacE ont été utilisés.

L'identification des motifs conservés confirme bien que BacE est un membre de la superfamille des ATPases AAA+.

En plus de ses motifs conservés, le domaine AAA possède une structure conservée entre les membres de cette superfamille. Ce domaine est divisé en deux sous-domaines (Erzberger & Berger, 2006; Wendler et al., 2012). Le sous-domaine « large AAA+ » $\alpha\beta\alpha$ contenant un feuillet- β formé de 5 brins- β portant les motifs Walker A et Walker B, le sensor 1 et l'arginine

finger (**Figure 54a**). Chez la plupart des AAA+, ce sous-domaine est fusionné avec un sous-domaine plus petit (small AAA+) formé exclusivement d'hélice α et contenant le sensor 2 (**Figure 54a**). Par le biais d'études phylogéniques menées dans le but de comprendre l'évolution et les fonctions communes des différents membres de la superfamille ATPase AAA+, des insertions spécifiques d'éléments structuraux ont été mis en évidence (en couleur sur la **Figure 54a**). À partir de ces « customisations » 7 clades ont émergé : *i*) les clamp loader (clade 1), *ii*) les initiateurs (clade 2), *iii*) les classiques (clade 3), *iv*) les hélicases de la superfamille III (clade 4), *v*) les HCLR (clade 5), *vi*) les H2-insert (clade 6) et *vii*) les PS2-insert (clade 7) (J. M. Miller & Enemark, 2016; Seraphim & Houry, 2020). La structure tertiaire du domain AAA se voit donc aussi modifiée en fonction des insertions de ces éléments structuraux (**Figure 54b**).

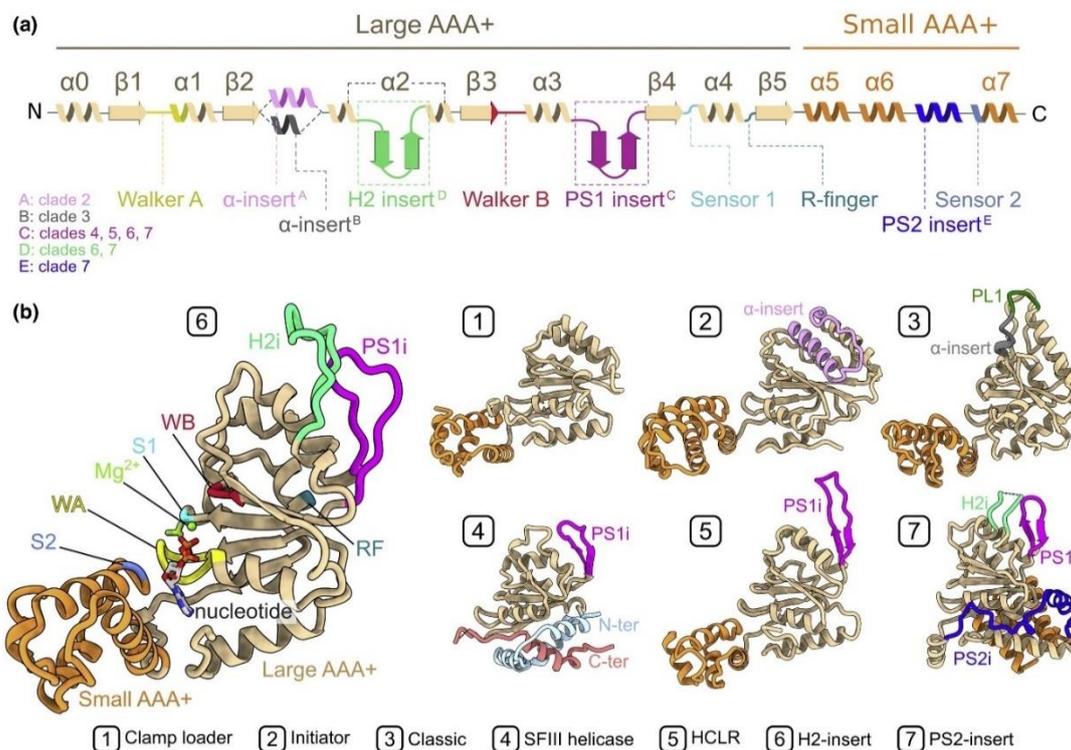


Figure 54 | Les domaines et structures des ATPases AAA+.

Structures secondaires et motifs constituant les deux sous-domaines large AAA+ et small AAA+. Les insertions spécifiques des différentes sous-familles d'ATPases (clade) sont indiquées (exceptées l'hélice en N-terminale et C-terminale du clade 4) (**a**). Structure tertiaire du monomère de chaque clade. Clade 1 = RFC3 (PDB 1SXJ), Clade 2 = Orc5 (PDB ID 5V8F), Clade 3 = ClpA-NTD (PDB 6UQE), Clade 4 = E1 helicase (PDB ID 2V9P), Clade 5 = RuvB (PDB 1HQC), Clade 6 = NtrC1 (PDB 4LY6), Clade 7 = Rava (PDB 3NBX). La structure tertiaire du clade 6 est élargie afin de représenter les motifs conservés. Les motifs et insertions sont colorés comme dans la partie a (**b**).

Dans le but de définir à quel clade appartient BacE, l'insertion des éléments structuraux et la structure tertiaire du domaine AAA ont été étudiées. L'essai de modélisation par le logiciel Swiss-model n'ayant pas fourni de modèle satisfaisant, c'est le modèle prédit par AlphaFold qui a été utilisé (

Figure 55). Une grande majorité des résidus et en particulier ceux du domaine AAA sont modélisés avec un score de confiance allant de fort à très fort. Quelques résidus possèdent un score de confiance faible à très faible mais ces derniers ne sont pas inclus dans l'étude.

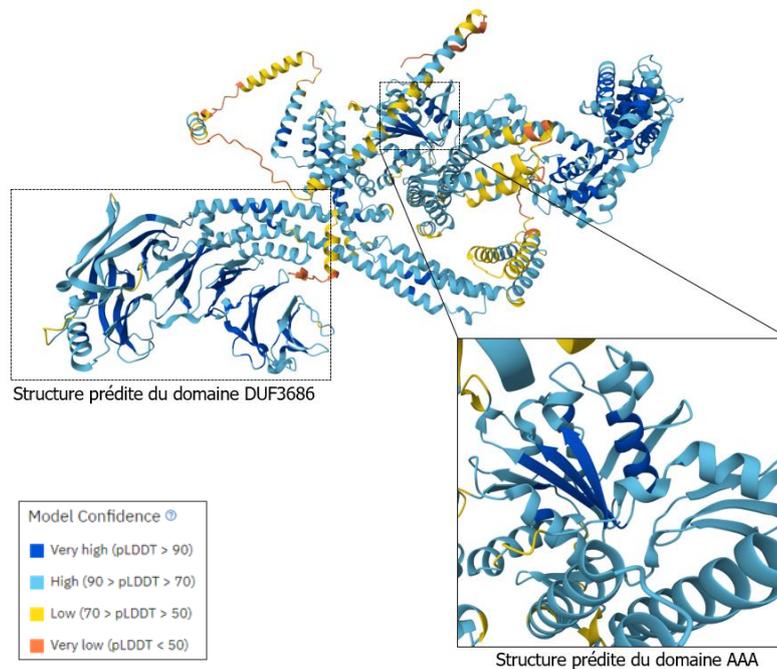
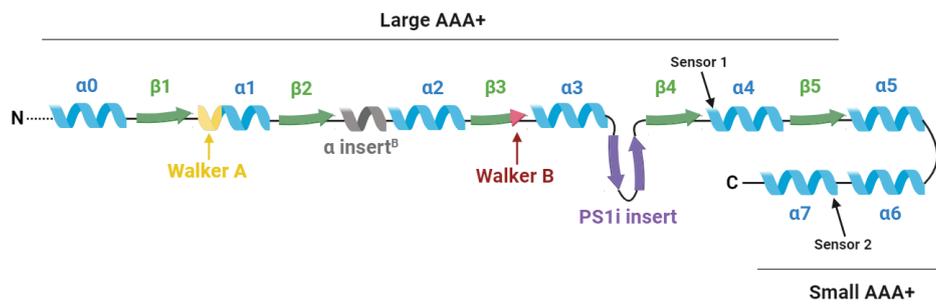


Figure 55 | Qualité du modèle de BacE prédit par AlphaFold.

Le domaine AAA de BacE contient bien les deux sous-domaines. Le sous-domaine large AAA+ $\alpha\beta\alpha$ est composé du feuillet- β formé par 5 brins- β tandis que le sous-domaine AAA+ est composé exclusivement d'hélices (**Figure 56a**). Le sous-domaine large AAA+ contient deux insertions d'éléments structuraux supplémentaires : l'hélice α^B et les 2-brins- β PS1i (**Figure 56a**). La conformation de la structure tertiaire de BacE et la localisation des motifs conservés au sein du domaine large AAA+ sont en accord avec la littérature (Wendler et al., 2012). Le domaine large AAA+ se caractérise par un feuillet- β formé par 5 brins- β parallèles arrangés dans un ordre précis : $\beta 5$ - $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 3$ - $\beta 2$. Le motif Walker A (en jaune) se trouve à proximité du brins- $\beta 1$ et au début de l'hélice $\alpha 1$ tandis que le motif Walker B (en rouge) se situe dans le brin- $\beta 3$. La région SRH contenant le senseur 1 et l'arginine finger se situe entre le $\beta 4$ et $\alpha 4$ et entre $\alpha 4$ et $\beta 5$ respectivement (**Figure 56b**).

a



b

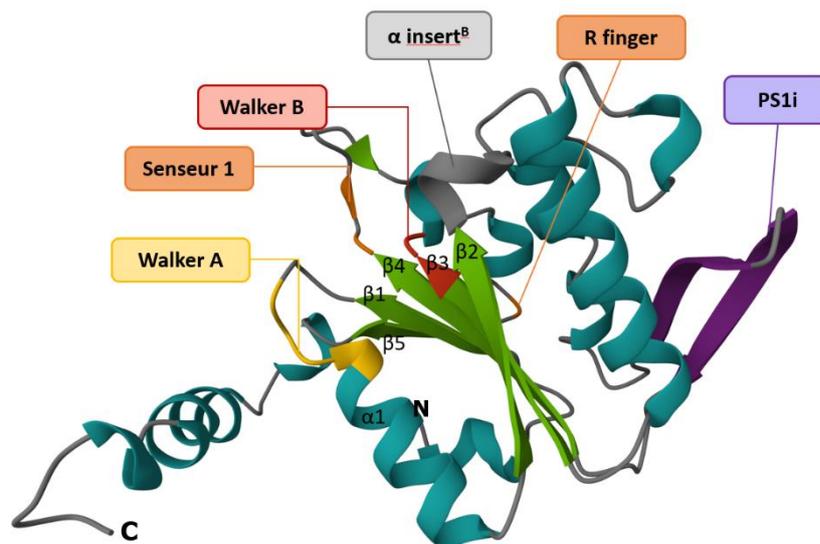


Figure 56 | Les motifs et insertions d'éléments structuraux dans le domaine AAA de BacE.

Structures secondaires, motifs et insertions d'éléments structuraux constituant les deux sous-domaines large AAA+ et small AAA+ de BacE (le senseur 2 n'est pas représenté). L'extrémité N-terminale, non étudiée ici, est représentée par les traits en pointillés (a). Structure tertiaire du domaine AAA (acides aminés allant de 1271 à 1460) prédit par AlphaFold. La structure de BacE a été modifiée à l'aide du logiciel Mol*(Star) en colorant les hélices α en bleues, les brins- β en verts et les motifs et éléments structuraux selon la partie a (b).

D'après ces observations, BacE pourrait appartenir au clade 3 (ATPases AAA+ classiques) dont les membres possèdent l'hélice α^B mais aussi au clade 5 (ATPases AAA+ HCLR) par le biais de son élément PS1i.

Les membres du clade 3 (ATPase classique) possèdent une hélice supplémentaire plus courte (Figure 54a et b). Ils possèdent aussi un second motif arginine finger. Pourtant aucun second motif arginine finger n'a été retrouvé chez BacE. Les membres du clade 5 (ATPase HCLR) possèdent uniquement l'insertion PS1i, or BacE semble posséder l'hélice supplémentaire plus courte du clade 3. BacE possède donc une structure qui ne peut être classée dans aucun clade.

Ces dernières années les structures nouvellement découvertes ont remis en question la classification des ATPases en clades, effectuée dans les années 2000. Les auteurs de

récentes revues concernant les ATPases AAA+ estiment que la classification en clades doit être rediscutée (Jessop et al., 2021; Puchades et al., 2020; Seraphim & Houry, 2020; S. Zhang & Mao, 2020). Ces phénomènes de divergence entre les structures des ATPases et les clades sont retrouvées en particulier chez les clades 5, 6 et 7. Ainsi quelques ATPases sont inclassables car elles possèdent des insertions d'éléments structuraux de plusieurs clades (Q. Ye et al., 2015).

Les membres du clade 3 sont les plus étudiés et sont connus pour leur rôle prédominant dans le remodelage et le remaniement de structures protéiques. Les plus connues sont les protéines du protéasome, VPS4, la katanine, la spastine, ClpB et Hsp104. Ces membres contiennent une boucle appelée PL1 responsable de la fixation au substrat protéique. Cette boucle contient des résidus aromatiques qui s'intercalent de façon non spécifique entre les acide aminés et forment ainsi un escalier en spirale (Gates & Martin, 2020; Striebel et al., 2009). Cette boucle PL1 et sa conformation en spirale sont conservées à travers tous les clades.

Les membres du clade 5 HCLR (HslU/ClpX, ClpABC-CTD, Lon et RuvB) possèdent uniquement l'élément structural situé juste avant le sensor 1 appelée le pré-sensor 1 (Ps1i). Elles partagent des similitudes fonctionnelles avec les membres du clade 3 car elles sont aussi impliquées dans le dépliement, le remodelage et le remaniement des protéines ou de complexes protéiques.

Les différents motifs constituant le domaine AAA forment la « poche de fixation à l'ATP ». Le motif Walker A interagit avec les phosphates de l'ATP via la lysine conservée afin de stabiliser la liaison avec l'ATP. La majorité des ATPases AAA+ s'oligomérisent pour former une structure en forme d'anneau composé de 6 sous-unités symétriques et un pore au milieu. Cette oligomérisation permet au motif arginine finger de se lier à la dernière liaison du groupement triphosphate (liaison γ -phosphate) durant l'hydrolyse. Le sous-domaine small AAA+ participe quant à lui à cette oligomérisation. Le pore situé au centre de la structure en anneau sert de passage pour le substrat (ADN, ARN et protéine).

Les mécanismes de remodelage de l'ADN et de l'ARN sont aujourd'hui bien connus, notamment grâce aux études cristallographiques, à la différence du mécanisme de remodelage des protéines qui pose encore questions. Certaines protéines comme la protéine Lon, possèdent une activité protéase grâce à un domaine protéase fusionné avec le domaine AAA. L'insert PS1i se positionne alors au centre de la structure en anneau et est crucial pour la fonction. Certaines études ont supposé que PS1i, lui aussi en forme d'escalier en spirale remplirait le rôle de PL1 mais pour transloquer l'ADN simple brins. Pour d'autres, PS1i possède plusieurs rôles : il permettrait l'interaction entre deux partenaires ou de simplement reconnaître les substrats sans les transloquer

Les ATPases AAA+ sont cruciales pour la protéolyse c'est-à-dire le dépliement et la dégradation des protéines. Chez les bactéries, ClpXP, ClpAP, HslUV, FtsH et Lon sont les 5 ATPases AAA+ à activité protéolytique les plus étudiées. Dans la plupart du temps, les activités ATPases et protéases proviennent de deux polypeptides distincts (ClpXP, ClpAP et HslUV) sinon ces deux activités sont présentes sur le même polypeptide (FtsH et Lon).

L'action des ATPases AAA+ a aussi son importance dans la lutte face aux agrégats protéiques. Les protéines qui présentent un défaut de repliement s'agrègent entre elles et à partir d'une certaine concentration d'agrégats, ces derniers deviennent toxiques pour la cellule. Ce phénomène s'observe notamment lors d'un stress environnemental. Chez les bactéries et les eucaryotes, les ATPases AAA+ respectives ClpB et Hsp104 (heat-shock protein 104) participent à la désagrégation des agrégats protéiques induits par le stress. En réalité ces deux protéines ne travaillent pas seules. Hsp104 coopère avec la protéine chaperonne Hsp70 pour solubiliser puis replier correctement les protéines agrégées. D'autres études ont confirmé la présence de ce réseau de « bi-chaperonne ». Il a donc été supposé que Hsp104 brise les agrégats en petits morceaux qui sont ensuite repliés par Hsp70. Cette collaboration a aussi été mise en évidence entre Hsp70 et ClpB mais le système reste encore peu compris. En effet, les agrégats protéiques sont par définition peu structurés et très hétérogènes et donc supposés difficilement reconnaissables par Hsp104 et ClpB. Pour le moment, il semblerait que ces deux ATPases reconnaissent des régions riches en acides aminés basiques et aromatiques.

Enfin le dernier rôle des ATPases AAA+ impliquées dans le remodelage protéique concerne le désassemblage de structure protéique.

La protéine membranaire BacE présente donc toutes les caractéristiques communes aux ATPases AAA+ : *i)* un domaine AAA, *ii)* des motifs conservés au sein de ce domaine, *iii)* un domaine large AAA+ composé de et un domaine small AAA+ composé exclusivement d'hélice, *iv)* un domaine large AAA+ en feuillet- β dans l'ordre précis et *v)* l'insertion d'éléments structuraux α^B et PS1i caractéristiques des clades classiques et HCLR.

D'après le rôle joué par les ATPases AAA+ de ces clades, BacE pourrait intervenir dans le remodelage, le repliement ou le désassemblage de structure protéique.

Cette hypothèse est cohérente si l'on considère les possibles superstructures formées par BacB (PspA homologue) et BacD (protéine SPFH flotilline). La présence d'une ATPase pourrait être nécessaire pour le repliement ou le désassemblage de ces superstructures.

En sachant que les ATPases AAA+ sont aussi impliquées dans le remodelage des acides nucléiques et compte tenu de l'annotation du domaine DUF3686, une possible fonction de BacE liée au remodelage des acides nucléiques ne peut être exclue.

III.4 La protéine BacF

D'après la base de données Pseudomonas Genome Database, la protéine BacF codée par le gène *PA14_16200*, présente une masse de 26,4 kDa et contient 230 acides aminés. Sur la base de données Uniprot, BacB est annotée comme une « Phospholipase D-like domain-containing protein ». Là encore cette annotation est à l'état « unreviewed ».

À l'image de BacE, la localisation de BacF est incertaine. D'après les prédictions de PSORTb, cette protéine est cytoplasmique (indice de confiance de 8,96 sur 10). Alors que DeepTHMM prédit BacE comme étant cytoplasmique (probabilité 1/1), Phobius l'a prédit comme non cytoplasmique (probabilité de 0,8/1) (annexe 6).

BacF, contient un domaine « Phospholipase D, PLD_like » (en bleu-vert, IPR025202) superposé sur un domaine « cardiolipine hydrolase » (en beige, PTHR 43856). À l'intérieur de ces domaines des sites actifs et un site catalytique ont été identifiés (**Figure 57**).

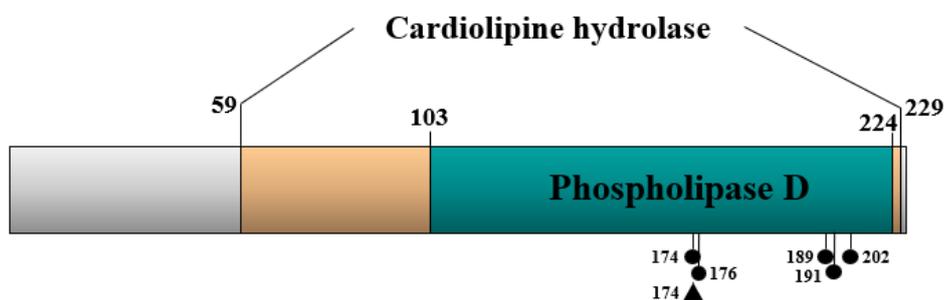


Figure 57 | Domaines identifiés chez la protéine BacF.

Les ronds et le triangle noirs indiquent respectivement des sites actifs et un site catalytique hypothétiques.

Plusieurs domaines provenant des bases de données PANTHER et CDD, non représentés sur la figure, chevauchent le domaine « PLD_like » : *i*) « PLDc_2 », *ii*) « PLDc_6 », *iii*) « endonucléase A » et *iv*) « nucléase ».

Les membranes des organismes vivants sont composées de lipides amphiphiles. Chez les bactéries, les lipides les plus répandus sont les phospholipides, les glycolipides, les lipides ornithines, les acides gras et le LPS. Chez les Gram négatif, les phospholipides représentent environ 40% des lipides totaux de la membrane interne tandis qu'ils ne représentent que 25% de la membrane externe. Les phospholipides les plus répandus chez *P. aeruginosa* sont la

phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), la cardiolipine (CL ou diphosphatidylglycérol), la phosphatidylcholine (PC) ou encore l'acide phosphatidique (PA). Chez *P. aeruginosa*, le phospholipide majoritaire, que ce soit de la membrane interne ou externe, est le phosphatidyléthanolamine (PE) (Pinkart & White, 1998).

Les cardiolipines sont connues pour leur forte capacité à créer des interactions avec une grande variété de protéines. Elles organisent ainsi spatialement les protéines membranaires formant des domaines ou microdomaines. En phase exponentielle, les cardiolipines sont minoritaires, en revanche sous-certaines conditions induisant une diminution de la croissance, elles deviennent majoritaires (Shibuya, 1992). Leur quantité augmente notamment en phase stationnaire de croissance (Short & White, 1971), en réponse à un stress osmotique (Catucci et al., 2004; Yasuhiro et al., 1972) ou encore lors d'une diminution du métabolisme énergétique (H. U. Koch et al., 1984). Le rôle des cardiolipines dans la stabilisation des membranes est encore peu connu. Il semblerait que les cardiolipines se regroupent préférentiellement aux pôles et dans les régions courbées des cellules (K. C. Huang et al., 2006; Kawai et al., 2004; Mileykovskaya & Dowhan, 2000). Cette localisation précise pourrait induire une ségrégation des protéines et surtout constituer une plateforme lipidique adéquate pour l'insertion de protéines spécifiques comme celles impliquées dans l'osmoprotection (Romantsov et al., 2007). Cette augmentation des cardiolipines est liée à l'augmentation de l'activité enzymatique de la cardiolipine synthase (Heber & Tropp, 1991; Hiraoka et al., 1993). Les cardiolipines synthases appartiennent à la superfamille des phospholipases D.

La superfamille des phospholipase D contient les cardiolipines synthases bactériennes, les phosphatidylsérines synthases eucaryotes et procaryotes, les protéines d'enveloppe poxvirus, la toxine murine de *Yersinia* et les endonucléases spécifiques et non spécifiques et les phospholipases D. Les membres de cette superfamille sont présents chez les virus, les bactéries, les levures, les animaux et les plantes. Les membres forment une superfamille d'homologues car ils possèdent une structure catalytique et un mécanisme réactionnel similaire (Koonin, 1996; Ponting & Kerr, 1996). Les membres de cette famille utilisent différents substrats estérifiés comme les phospholipides, les acides nucléiques et les protéines phosphorylées.

Cette superfamille possède la capacité d'hydrolyser la liaison phosphodiester de la PC ce qui forme le second messenger PA et la choline. Le PA sert de second messenger tandis que la choline est utilisée dans le métabolisme des phospholipides (Ponting & Kerr, 1996). Les membres de cette superfamille contiennent tous la séquence catalytique HxK(x)₄D(x)₆G(G/S)xN, où x est un acide aminé quelconque (Ponting & Kerr, 1996). Ce motif appelé HKD forme le domaine catalytique (ou site actif) crucial pour l'activité de ces enzymes

(Metrick et al., 2020). Chez les eucaryotes, les membres contiennent deux motifs HKD révélant un phénomène de duplication génique, un domaine PX/PH (phox homology/pleckstrin homology) ou un domaine C2. Ces domaines contrôlent l'insertion de l'enzyme dans la membrane et régulent l'activité enzymatique.

La seule exception concerne la phospholipase eucaryote PLD6 (aussi appelée mitoPLD). En effet, ce membre ne contient pas deux motifs HKD mais qu'un seul motif HKD. PLD6 est donc plus proche des membres procaryotes qui ne contiennent eux aussi qu'un seul motif HKD (**Figure 58**). Une exception concerne la protéine PldA de *P. aeruginosa* qui possède un domaine PX/PH et deux motifs HKD (X. Yang et al., 2022).

Un second motif de séquence RGV est aussi conservé entre les membres. À ce jour sa fonction est inconnue mais il est supposé impliqué dans l'interaction avec le substrat.

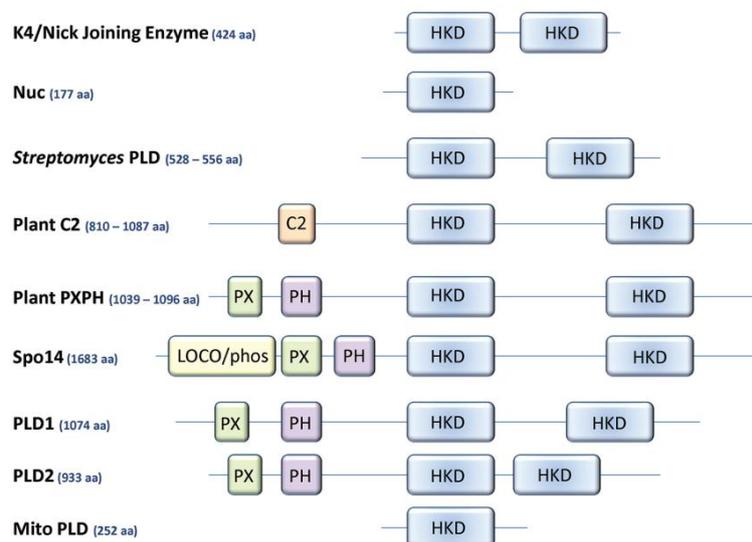


Figure 58 | Domaines et motifs présents chez les différents membres de la superfamille des phospholipases D.

Le motif HKD est responsable de l'activité catalytique et est conservé parmi les membres. Certains membres possèdent dans leur extrémité N-terminale des domaines régulateurs non conservés. Nuc : endonucléase et PLD : phospholipase D.

Au fur et à mesure des études structurales et fonctionnelles, deux classes se sont dessinées. Les membres de la première classe, qui possèdent deux motifs HKD, sont impliqués de façon privilégiée dans l'hydrolyse des lipides. Les membres de la seconde classe, qui possède un unique motif HKD, affichent une activité endonucléase prédominante qui coupe en fragments les séquences d'acides nucléiques (Ponting & Kerr, 1996).

L'analyse de la structure de BacF révèle un seul motif HKD (**Figure 59a**). Un alignement a donc été réalisé avec des protéines possédant elles aussi un seul motif HKD : la protéine Nuc de *S. typhimurium*, la PLD6 humaine (aussi appelée Mito PLD) et Zucchini de *Drosophila*

melanogaster (Figure 59b). BacF partage respectivement 29,55%, 29,49% et 33,65% de pourcentage d'identité de séquence avec PLD6, Nuc et Zucchini. Ces premiers résultats suggèrent que BacF appartiendrait à la seconde classe contenant les membres prédestinés à une activité enzymatique de type endonucléase.

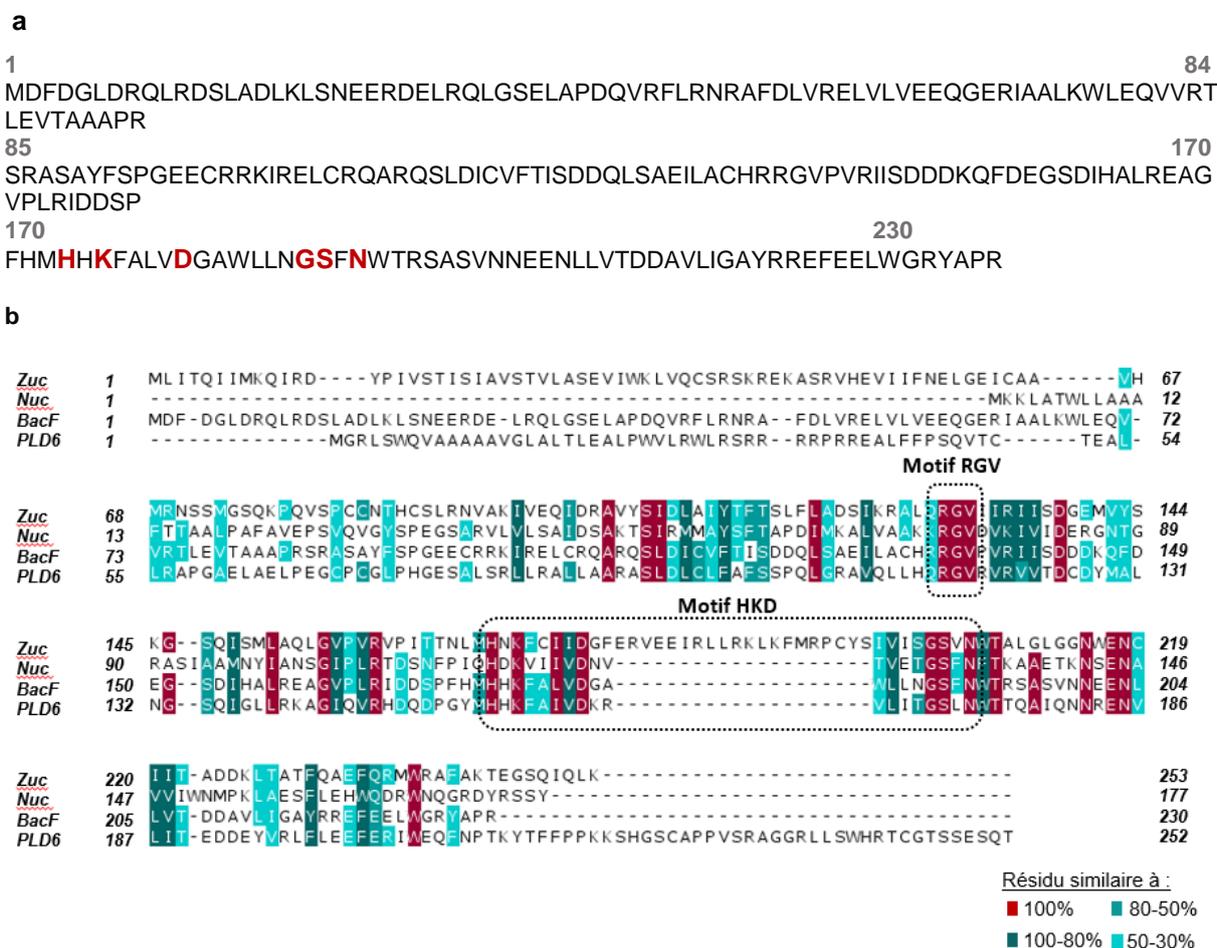


Figure 59 | BacF fait partie de la superfamille des phospholipases D

Motif HKD identifié chez BacF (en rouge et en gras) (a). Alignement réalisé avec Clustal Omega et modifié à l'aide de Jalview. Les résidus sont coloriés selon leur pourcentage de conservation (option BLOSUM62 score). Les motifs RGV et HKD sont entourés en pointillé (b).

Pour confirmer l'appartenance de BacF à la superfamille des phospholipases D, la structure tertiaire du motif HKD a été comparée à celle des membres de la superfamille des phospholipases D. Étant donné que BacF ne contient qu'un seul motif HKD, la comparaison s'est effectuée avec les structures de PLD6 de la souris (accession PDB 4GGJ ; (Ipsaro et al., 2012)) Nuc de *S. thyphimurium* (accession PDB 1BYR ; (Stuckey & Dixon, 1999)) et Zucchini de *Drosophila melanogaster* (accession PDB 4GEL ; (Nishimasu et al., 2012)). Pour la comparaison c'est le modèle prédit par AlphaFold qui a été utilisé.

Le modèle AlphaFold de BacF possède un très bon score de confiance, en particulier l'extrémité N-terminale. Seule la partie reliant l'extrémité C-terminale à l'extrémité N-terminale possède des scores de confiance plus faibles (**Figure 60a**).

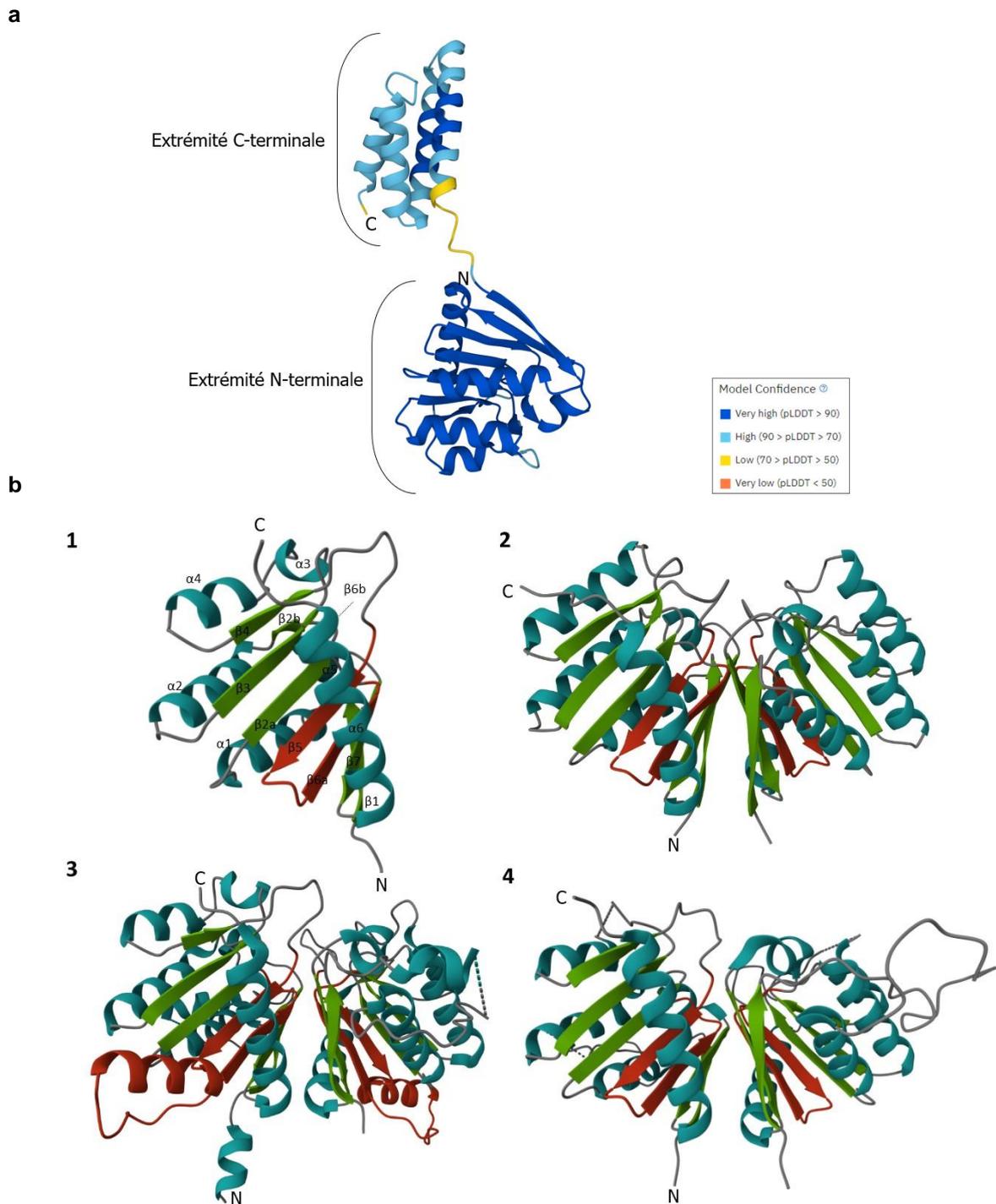


Figure 60 | Le motif HKD de BacF adopte une structure similaire à celui des autres membres.

Qualité du modèle de BacF prédit par AlphaFold (**a**). Structure tertiaire du motif HKD. Les structures de BacF (1), Nuc (2, PDB 1BYR), Zucchini (3, PDB 4GEL) et PLD6 (4, PDB 4GGJ) ont été modifiées à l'aide du logiciel Mol*(Star) en colorant les hélices α en bleues, les brins- β en verts et le motif HKD en rouge (**b**).

Les différentes études structurales ont révélé que les protéines Nuc, Zucchini et PLD6 se dimérisent rendant le site catalytique, situé au centre du dimère, actif (**Figure 60b**). Chaque monomère porte donc « la moitié » du site actif et est composé d'hélice α et de brins- β . Le motif HKD est retrouvé, de façon conservée, sur les brins $\beta 5$ et $\beta 6$. Au centre de ce dimère, les histidines chacune situées sur un motif HKD, sont adjacentes. Le feuillet- β est entouré d'hélices α , c'est pourquoi le terme de « sandwich » est régulièrement retrouvé dans la littérature. Ce site actif est maintenu en place grâce à des liaisons hydrogènes (Bowling et al., 2021; Ipsaro et al., 2012; Leiros et al., 2000; Metrick et al., 2020; Nishimasu et al., 2012; Voigt et al., 2012; Y. Zhao et al., 1997).

Cette conformation est aussi visible chez BacF, le feuillet- β de 7 brins- β est pris en sandwich par 6 hélices α . Deux brins- β supplémentaires sont aussi présents (notés $\beta 2b$ et $\beta 6b$). Enfin, le motif HKD est bien retrouvé sur les brins $\beta 5$ et $\beta 6a$.

La position des histidines au sein du dimère est cruciale pour le mécanisme réactionnel. Ce dernier se fait selon un mécanisme nommé « ping-pong » (Stuckey & Dixon, 1999). Le principe repose sur une attaque nucléophile. L'histidine du motif HKD du premier monomère sert de nucléophile pour attaquer le groupement phosphate du substrat. Cette attaque nucléophile libère un groupement choline et forme simultanément une molécule intermédiaire qui correspond à une phospho-histidine (aussi appelée phosphoenzyme). L'histidine présente sur le motif HKD du second monomère sert d'électrophile qui clive la liaison phosphodiester libérant une molécule de PA.

Pour les membres qui possèdent deux motifs HKD, le principe est le même. Lorsque la protéine adopte sa conformation tertiaire, les deux histidines, chacune située sur un motif HKD, sont adjacentes. Selon les membres, l'histidine du motif HKD en N-terminal sert de nucléophile et l'histidine du motif HKD en C-terminal sert d'électrophile ou inversement.

La découverte de la superfamille des phospholipases D provient des études sur les protéines Nuc d'*E. coli* et de *S. typhimurium*. Cette protéine fût le premier membre de cette superfamille à être identifiée. Un monomère Nuc est composé d'un feuillet- β de 8 brins- β pris en sandwich par 5 hélices α . La protéine Nuc est une endonucléase dont le gène est localisé sur un plasmide pKM101 retrouvé chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Ce plasmide porte environ 15 gènes dont certains impliqués dans la conjugaison, dans l'amplification du processus SOS de réparation de l'ADN responsable de mutagénèse induite ou dans la résistance aux β -lactamases (gène *bla*) (Langer et al., 1981). Une fois codée, Nuc est une protéine d'abord cytoplasmique qui devient définitivement périplasmique grâce au clivage de son peptide signal. Nuc, en tant qu'endonucléase, hydrolyse la liaison phosphodiester au sein de l'ADN et de l'ARN double brins. Son activité est maximale lorsqu'elle est en présence de cations mais

n'est pas inhibée en présence d'EDTA. Le rôle fonctionnel de la protéine Nuc est à ce jour inconnue. Elle est pour le moment considérée comme une protéine auxiliaire à la conjugaison.

La protéine Zucchini est conservée chez les animaux et est ancrée dans la membrane de la mitochondrie grâce à son extrémité N-terminale en hélice α . La protéine Zucchini possède une similarité de séquence élevée avec les endonucléases bactériennes Nuc. Il fût donc supposé que Zucchini posséderait aussi une fonction de type endonucléase. Le site actif de Zucchini est constituée d'un feuillet- β de 8 brins- β pris en « sandwich » par des hélices α . La structure du Zucchini, ainsi élucidée, est venue confirmer la présence d'une activité endonucléase et plus particulièrement endoribonucléase spécifique des acides nucléiques (ADN et ARN) simple brin. Le dimère peut en effet, se fixer à un ARN pour générer des piRNAs (Nishimasu et al., 2012).

Chez l'Homme, les phospholipases D sont classées en 6 isoformes allant de PLD1 à PLD6. L'isoforme PLD6 est la seule isoforme très proche des protéines Nuc et Zucchini (Y. Zhao et al., 1997). PLD6 possède un domaine transmembranaire à son extrémité N-terminale lui permettant de s'ancrer dans la membrane de la mitochondrie (d'où son nom Mito PLD). PLD6 possède une activité « cardiolipine hydrolase » qui génère le PA (S.-Y. Choi et al., 2006; H. Huang et al., 2011). Ce PA, localisé à la surface de la mitochondrie, régule à travers un réseau de signaux lipidiques, sa taille dans le but par exemple d'augmenter la production d'énergie ou de « marquer » une mitochondrie en cours d'autophagie. Le PA permet donc d'augmenter les phénomènes de fusion des mitochondries tandis que, lorsque le PA est converti en diacylglycérol, ce sont les phénomènes de fission qui sont privilégiés. Dans le même temps, une activité endoribonucléase, similaire à celle de Zucchini a été identifiée. Cette activité génère aussi, à partir d'acides nucléiques (ADN et ARN), des piRNAs dont le rôle est crucial pendant la spermatogénèse (H. Huang et al., 2011; Voigt et al., 2012; Watanabe et al., 2011).

Les piRNAs, aussi appelés Piwi RNA, ont de nombreux rôles. Ils font partie d'une stratégie de défense des eucaryotes face aux éléments génétiques transposables selon une stratégie basée sur l'interférence à l'ARN. C'est un processus de défense actif qui permet de « rendre silencieux » les transposons (Aravin et al., 2007). Le même principe existe chez les bactéries, c'est le système CRISPR. Ce système est constitué de cassettes contenant des séquences répétées provenant de phages ou de plasmides. Ces séquences ont été capturées lors de précédentes invasions. Ce système CRISPR est donc une « mémoire » qui ajoute à chaque invasion, un fragment d'ADN extra-chromosomique. Durant la seconde invasion du phage ou du plasmide, la cassette CRISPR est transcrite en petits ARN, chacun spécifique d'un phage ou d'un plasmide déjà rencontré. Ces petits ARN vont cibler l'ADN étranger qui sera éliminé grâce à l'action de nucléases Cas (Horvath & Barrangou, 2010).

BacF n'ayant jamais été étudiée auparavant, aucune activité enzymatique ni propriété d'oligomérisation ont été pour le moment mises en évidence. En revanche, un des modèles prédits par Swiss-Model se base sur le template du dimère Zucchini. Ce modèle possède un score moyen mais est en accord avec la littérature. Dans ce modèle, les histidines présentes sur chacun des motifs HKD sont bien adjacentes (**Figure 61a**).

La taille du site actif forme une « poche » qui accueille le substrat. La taille de cette poche varie selon les membres et permet de sélectionner le substrat. Chez les eucaryotes, sauf PLD6, cette poche est étroite et plus profonde que celle des endonucléases, permettant la fixation aux phospholipides (voir PLD **Figure 61b**). Chez les procaryotes et PLD6 la poche forme une rainure allongée plus adaptée pour la fixation des acides nucléiques (voir PLD6 et Nuc **Figure 61b**). La poche de PLD6 est aussi plus étroite que celle de Nuc, permettant la fixation d'acides nucléiques uniquement simple brin. La poche de Nuc et PLD6 est tapissée de charges positives alors que chez les autres membres ce sont des charges négatives (Yao et al., 2021). La poche formée par le dimère de BacF semble similaire à celle de Nuc et PLD6 (**Figure 61b**) ce qui suggère une activité enzymatique de type endonucléase.

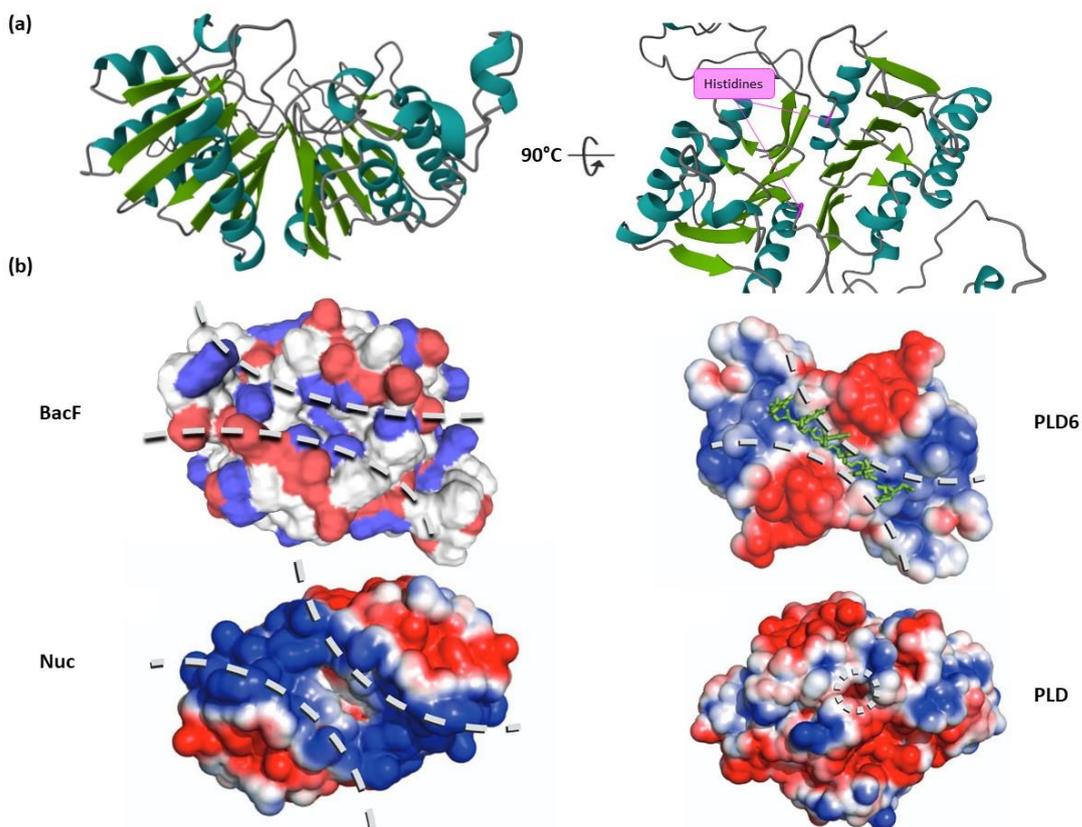


Figure 61 | La poche formée par le dimère prédit de BacF est similaire à la poche de Nuc et PLD6. Dimère, prédit par Swiss-Model, vu de face (à gauche) et du dessus (à droite). Les histidines des motifs HKD sont indiquées en rose. Les structures de BacF ont été modifiées à l'aide du logiciel Mol*(Star) en colorant les hélices α en bleues, les brins- β en verts (**a**). Comparaison de la poche de BacF à celles des autres endonucléases (Nishimasu et al., 2012). Les structures sont colorées selon la charge et la molécule d'ARN présentée dans la poche de PLD6 est colorée en vert (**b**).

Alors que Nuc et Zucchini ont pour seuls substrats les acides nucléiques, PLD6 a pour substrats des acides nucléiques et les cardiolipines. Il est pour le moment impossible d'attribuer un substrat précis à BacF. Par homologie, ces derniers peuvent être des acides nucléiques mais aussi des phospholipides comme les cardiolipines.

Pour conclure BacF possède toutes les caractéristiques d'un membre de la superfamille des phospholipases D : *i)* un motif RGV, *ii)* un site catalytique de motif conservé HxK(x)₄D(x)₆G(G/S)xN et *iii)* une conformation présentant un feuillet- β pris en sandwich par des hélices α et exposant l'histidine au centre.

IV. Discussion et hypothèses sur la régulation du système BAC

Chez toutes les bactéries, maintenir l'homéostasie et l'intégrité membranaire est vital. Il n'est donc pas étonnant de retrouver chez ces dernières, des systèmes protéiques conservés dédiés à la protection, à la perception de stress, à la transduction du signal et à la réponse au stress.

Le système Psp fait partie de ces systèmes conservés car il est retrouvé chez les protéobactéries, les actinobactéries et les firmicutes. Ces systèmes Psp possèdent tous un gène *pspA* conservé mais présentent un environnement génique variable par rapport au système Psp d'*E. coli*. Au regard de l'étonnante conservation du gène *pspA* chez tous ces systèmes, des études phylogénétiques ont été entreprises afin de comprendre l'évolution de PspA et d'identifier des nouveaux partenaires.

Concernant *P. aeruginosa*, les travaux précédents menés sur BacA et BacB suggèrent la présence d'un système Psp (Macé et al., 2008). Nos études bio-informatiques proposent que : BacB est une protéine cytoplasmique de la famille des PspA/IM30 ; BacC et BacD sont membranaires et formeraient un couple NfeD/SPFH ; la localisation de BacE et BacF est incertaine, ces protéines appartiendraient respectivement à la superfamille des ATPases AAA+ et à la superfamille des phospholipases D. Toutes ces données correspondent parfaitement au système Psp décrit chez *Dokdonia* par Ravi et collaborateurs :

- BacA serait une protéine avec un domaine DUF2170 de la famille de Yjfl d'*E. coli*
- BacB serait une protéine homologue à PspA,
- BacC serait une protéine à trois domaines transmembranaires similaire à la protéine YqiJ d'*E. coli* ou YuaF de *B. subtilis*,
- BacD serait une protéine contenant un domaine transmembranaire, un domaine Band7, une région coiled-coil et un domaine flotilline,
- BacE serait une ATPase AAA+
- BacF serait une phospholipase D.

Rien dans la littérature évoque un système Psp chez *P. aeruginosa*, hormis les travaux du Dr. Macé (Macé et al., 2008).

La réponse Psp est régulée finement par des mécanismes de régulation plus ou moins complexes selon les espèces. Le mécanisme de régulation de la réponse Psp est bien connu chez *E. coli*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* et *Y. enterocolitica* et est décrit plus en détails ci-dessous.

- **Le système Psp d'*E. coli* :**

La régulation et le fonctionnement du système Psp est très complexe et n'est encore que partiellement élucidée (**Figure 62**). Chez *E. coli*, la protéine PspA est cytoplasmique ou localisée à la périphérie de la membrane interne. Les protéines PspB, C et D sont localisées dans la membrane interne, PspE est située dans le périplasme et PspG est prédite comme étant une protéine de la membrane interne (Brissette et al., 1991).

Les protéines PspBC sont les unités senseurs du stimulus et leur localisation à la membrane ne se fait pas aléatoirement. Ces protéines sont retrouvées aux niveaux des pôles de la cellule riches en cardiolipines (Engl et al., 2009). Ce lipide anionique est d'ailleurs le deuxième plus abondant de la membrane interne après le phosphatidylglycérol et est impliqué dans la signalisation. Chez une souche *E. coli* déficiente dans la production de cardiolipine et en condition de stress, la signalisation du stimulus médiée par PspBC est diminuée et la localisation de PspA à la membrane est abolie (Jovanovic, Mehta, Ying, et al., 2014). À cette même période, une autre équipe, a démontré que la localisation de la flotilline FloT était aussi dépendante de la cardiolipine et que cette organisation était importante pour la signalisation membranaire chez *B. subtilis* (Bach & Bramkamp, 2013; Donovan & Bramkamp, s. d.). Jovanovic et collaborateurs ont incorporé dans leur étude sur le système Psp la flotilline YqiK (abordée lors de l'étude bio-informatique de BacD). La flotilline YqiK est elle aussi localisée au niveau des pôles et sa mutation induit une réduction de l'induction du système. Les auteurs en conclurent que la cardiolipine et YqiK amplifient la signalisation du stimulus (Jovanovic, Mehta, Ying, et al., 2014).

Les deux acteurs pivots du système sont PspA et PspF. PspF en tant que régulateur transcriptionnel forme un complexe avec l'ARN polymérase et le facteur sigma σ^{54} afin d'activer la transcription de l'opéron *pspABCDE*, du gène *pspG* et de son propre gène (Jovanovic et al., 1996). En condition non inductrice, PspA, sous forme d'oligomères, forme un complexe avec l'hexamère PspF qui cible le promoteur et qui inactive soit sa propre transcription soit celle de *pspG* (Dworkin et al., 2000). Le complexe PspA-PspF peut aussi se déplacer dans la cellule et aller au contact des protéines PspBC afin « d'évaluer » leur état (stimulée ou non), en sachant que l'état de PspBC reflète l'état de la membrane. Si aucun stimulus n'est présent, le complexe retourne ensuite sur l'un des promoteurs.

En condition inductrice, PspB et PspC sont constamment stimulées et PspC induit un changement conformationnel permettant la transduction du signal à PspA. Cette dernière change de partenaire en libérant PspF et en se fixant aux protéines PspBC (Adams et al., 2003). Les deux protéines ainsi libérées sont prêtes à jouer leur rôle respectif. Au niveau du site membranaire endommagé, PspA forme un complexe oligomérique de 36 unités en forme de donut afin de protéger l'intégrité de la membrane (Engl et al., 2009; Kleerebezem et al., 1996). De son côté, PspF active la transcription de l'ensemble des gènes du système.

PspA peut aussi être recrutée non pas au niveau des pôles mais dans les régions longitudinales, par MreB et RodZ. MreB est une protéine du cytosquelette homologue à l'actine qui a un rôle majeur dans le maintien et la modulation de la morphologie cellulaire via la synthèse du peptidoglycane. La protéine transmembranaire RodZ interagit du côté périplasmique avec les enzymes de synthèse du peptidoglycane et interagit grâce à son domaine cytoplasmique avec MreB (Shi et al., 2018).

Le système retourne à un état non induit par un phénomène de boucle d'auto-induction. Le rôle de PspG est encore mal connu mais il semble impliqué dans la cascade de signalisation lorsque le système est induit par la sécrétine IV du phage filamenteux (Jovanovic et al., 2006; Lloyd et al., 2004). Enfin, les rôles respectifs de PspD et PspE restent encore inconnus bien qu'une activité de type sulfurtransférase ait été attribuée à PspE (Adams et al., 2002).

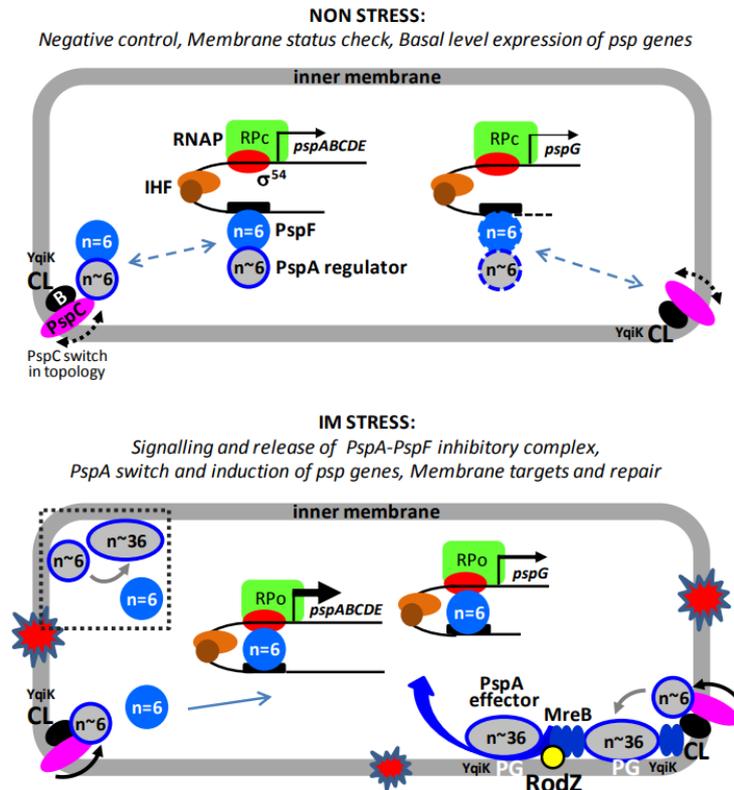


Figure 62 | La réponse Psp chez *E. coli*.

Voir le texte pour l'explication. RPc : close promoter complex, RPO : open promoter complex, CL : cardiolipine (Jovanovic, Mehta, Ying, et al., 2014).

- **Les systèmes Psp de *B. subtilis* :**

Deux systèmes Psp cohabitent chez *B. subtilis*. L'un implique la protéine LiaH, l'autre PspA, ces deux protéines étant homologues à PspA.

La réponse Psp médiée par LiaH est régulée par un système à trois composants (**Figure 63**) (Wolf et al., 2010). Le gène *liaH* fait partie de l'opéron *liaIHGFSR*. Cet opéron code une protéine membranaire LiaI, le système de régulation à trois composants LiaFSR et LiaG qui est de fonction inconnue.

En absence de stress, le promoteur situé en amont de *liaG* maintient une expression basale de *liaGFSR* et LiaS, le senseur qui possède une activité kinase-phosphatase est inhibé par la protéine membranaire LiaF par des interactions protéine-protéine supposées (Jordan et al., 2006; Schrecke et al., 2013). LiaS étant inhibée, elle ne peut donc pas phosphoryler le régulateur de réponse LiaR, ce qui le rend inactif. En présence de stress perturbant la membrane, en particulier la présence d'antibiotiques, LiaS est libérée et active LiaR par phosphorylation. LiaR phosphorylée se fixe à la région promotrice en amont de *liaI* induisant une forte expression de l'opéron *liaIHGFSR* (Schrecke et al., 2013). Le mécanisme employé par LiaF pour inhiber LiaS reste encore inconnu. En absence de stress, LiaH est cytosolique et LiaI est localisée à la membrane. En présence d'un stress, la concentration de ces deux protéines augmentent considérablement et LiaI recrute LiaH du côté cytoplasmique de la membrane (Domínguez-Escobar et al., 2014). Le complexe LiaIH, formé en réponse aux dommages de la membrane par les antibiotiques, contribue à préserver l'intégrité de la membrane. LiaH ne dispose pas des fonctions régulatrices exercées par PspA sur le facteur de transcription PspF.

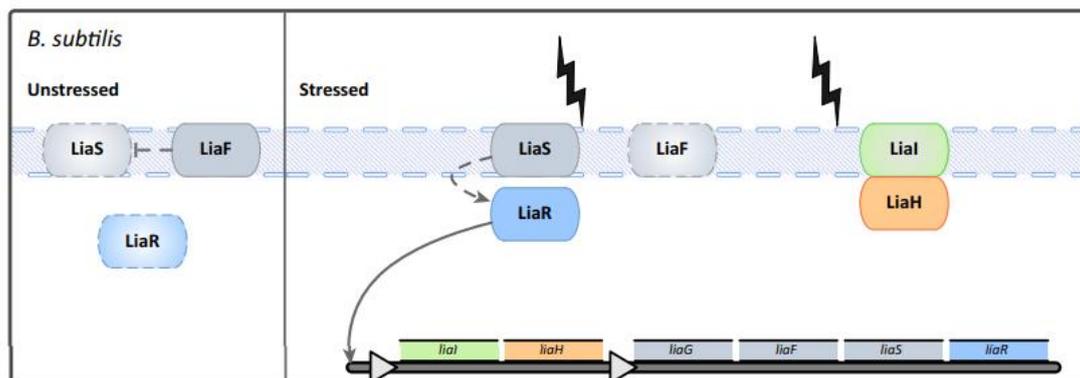


Figure 63 | La réponse Psp chez *B. subtilis*.

À l'état non induit, LiaF inhibe le senseur LiaS par un mécanisme encore inconnu (flèche à extrémité droite et en pointillés). LiaR, le régulateur de réponse, est à l'état inactif car non phosphorylé. Les protéines LiaI et LiaH sont respectivement membranaire et cytosolique. À l'état induit, LiaS perçoit les stimuli provenant de la membrane et active LiaR par phototransfert (flèche en pointillés). Ce dernier se fixe dans la région opéronique de *liaIH* et active la transcription (flèche épaisse). La protéine LiaI recrute LiaH à la face cytoplasmique de la membrane. Le complexe LiaIH joue un rôle dans la conservation de l'intégrité membranaire suite aux dommages provoqués par les antibiotiques (Manganelli & Gennaro, 2017).

Le second système Psp de *B. subtilis* a été le dernier décrit pour la première fois en 2021 (Z. Yang et al., 2021). Le gène *pspA* fait partie de l'opéron *pspA-ydj* régulé par le facteur sigma σ^W (Figure 64). Le régulon de ce facteur sigma est impliqué dans la protection de la membrane face aux effets perméabilisants des peptides antimicrobiens produits par les bactéries Gram positif. Les protéines YdjG et YdjH sont des protéines membranaires. La régulation de la réponse Psp de ce système n'est pas encore totalement élucidée.

À l'état induit, la concentration cellulaire de PspA augmente mais pas celle de YdjGHI, ce qui est cohérent car il existe un terminateur de la transcription entre *pspA* et *ydjGHI*. La protéine PspA interagit avec la membrane uniquement grâce à la protéine SPFH YdjI. En revanche en l'absence de *pspA*, YdjI est toujours présente à la membrane. La protéine YdjI est une protéine SPFH particulière car elle ne possède pas de domaine transmembranaire suggérant qu'elle doit interagir avec d'autres partenaires membranaires pour être correctement localisée.

La délétion de *ydjH* et *ydjG* abolit complètement la localisation membranaire de YdjI et celle de PspA, révélant ainsi un véritable réseau d'interactions. La formation du complexe YdjI et PspA nécessite donc les protéines membranaires YdjG et YdjH. De plus, en condition de stress la délétion de *ydjH* et *ydjG* induit une sévère déformation de la morphologie de la cellule, similaire à celle observée chez des souches déficientes pour les gènes codants les enzymes de synthèse du peptidoglycane. La délétion de *ydjG* induisant le phénotype le plus sévère, les auteurs en ont conclu que YdjG serait impliquée dans la signalisation du stress d'enveloppe mais aussi dans la synthèse du peptidoglycane. À la différence de la protéine PspA d'*E. coli*, la localisation de PspA ne dépend pas de la protéine MreB (Z. Yang et al., 2021).

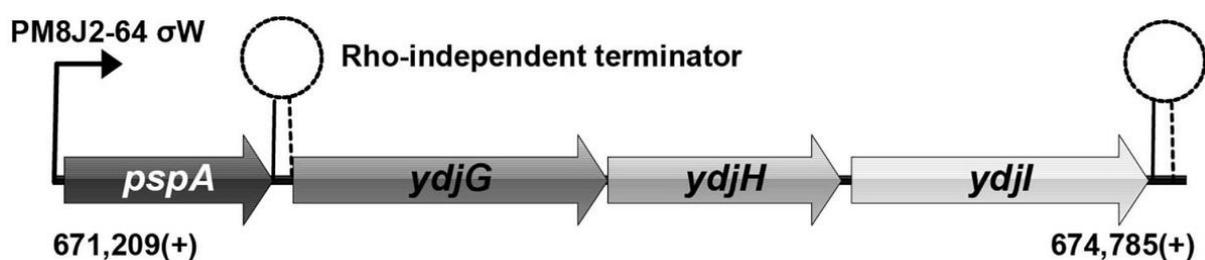


Figure 64 | Représentation schématique de l'opéron *pspA-ydj* de *B. subtilis*.

L'expression de cet opéron est dépendante du facteur sigma W (Z. Yang et al., 2021).

- **Le système Psp de *M. tuberculosis* :**

Toutes les mycobactéries, sauf *M. leprae*, possèdent dans leur génome le gène *pspA*. Chez *M. tuberculosis*, ce gène fait partie d'un opéron composé de 4 gènes (Figure 65). Le régulateur transcriptionnel de réponse *clgR*, *pspA* et deux gènes codant des protéines de fonctions inconnues, *rv2743c* et *rv2742c*. Cet opéron est régulé par ClgR, le facteur sigma accessoire de stress d'enveloppe SigE, lui-même régulé par le système à deux composants MprA-MprB. Ce réseau de régulations est impliqué dans la réponse au stress de surface et dans la création de cellules persister résistantes aux molécules antimicrobiennes.

La protéine senseur MprB s'autophosphoryle et active le régulateur de réponse MprA par phosphotransfert. MprA phosphorylé active la transcription du facteur sigma SigE. Le régulon du facteur sigma SigE comprend le régulateur positif de la transcription ClgR (Manganelli et al., 2023). En absence de stress, PspA inhibe ClgR par interaction protéine-protéine. En condition de stress, PspA libère ClgR qui active à son tour l'expression de l'opéron. En parallèle, PspA s'associe aux protéines Rv2743c et Rv2742c localisées à la membrane (Manganelli & Gennaro, 2017).

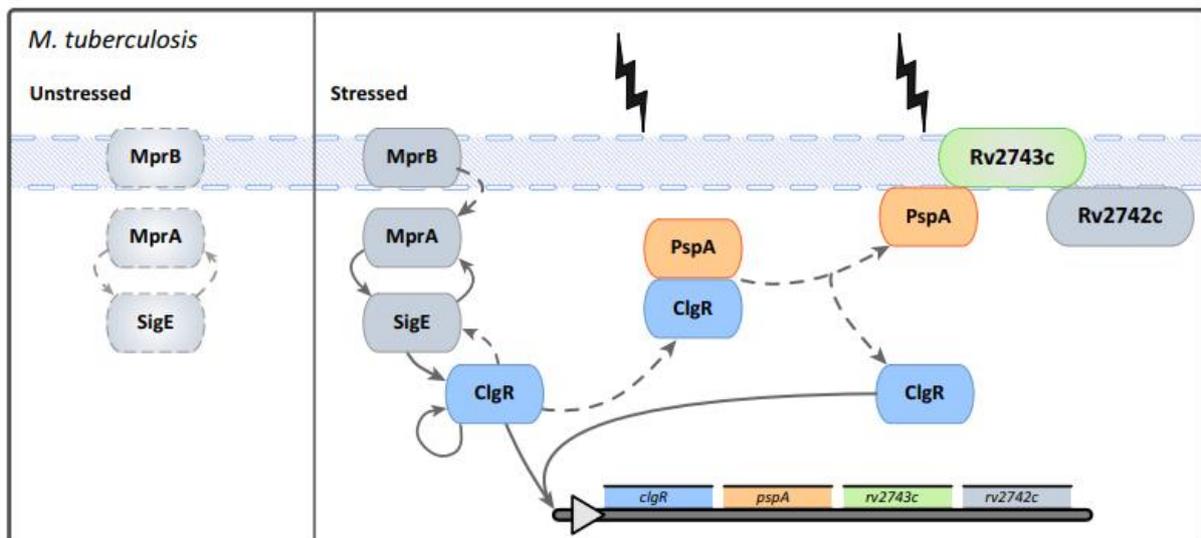


Figure 65 | La réponse Psp chez *M. tuberculosis*.

À l'état non induit, ClgR le régulateur de la transcription n'active pas la transcription de l'opéron. En présence de stress, la protéine senseur MprB s'autophosphoryle et active le régulateur de réponse MprA par phosphotransfert (flèche en pointillés). MprA active la transcription du facteur sigma accessoire SigE qui active à son tour la transcription de ClgR (flèche épaisse). ClgR se fixe dans la région promotrice de l'opéron et active la transcription (flèche épaisse). Les protéines Rv2743c et Rv2742c recrute PspA à la membrane (flèche épaisse) (Manganelli & Gennaro, 2017).

- **Le système Psp de *Y. enterocolitica* :**

Chez *Y. enterocolitica*, l'opéron de 7 gènes *pspABCDycjXF* et le gène *pspF* codent le système Psp (Figure 66). En absence de stress, PspA séquestre PspF dans le cytoplasme. Les protéines membranaires PspB et PspC forment un complexe qui est à l'état « OFF ». En présence de stress, le complexe membranaire PspBC passe à l'état « ON » ce qui permet l'interaction avec PspA. PspF en tant que régulateur positif de la transcription, active l'expression de l'opéron *pspABCDycjXF* et PspA interagit avec le complexe membranaire PspBC (S. Yamaguchi & Darwin, 2012).

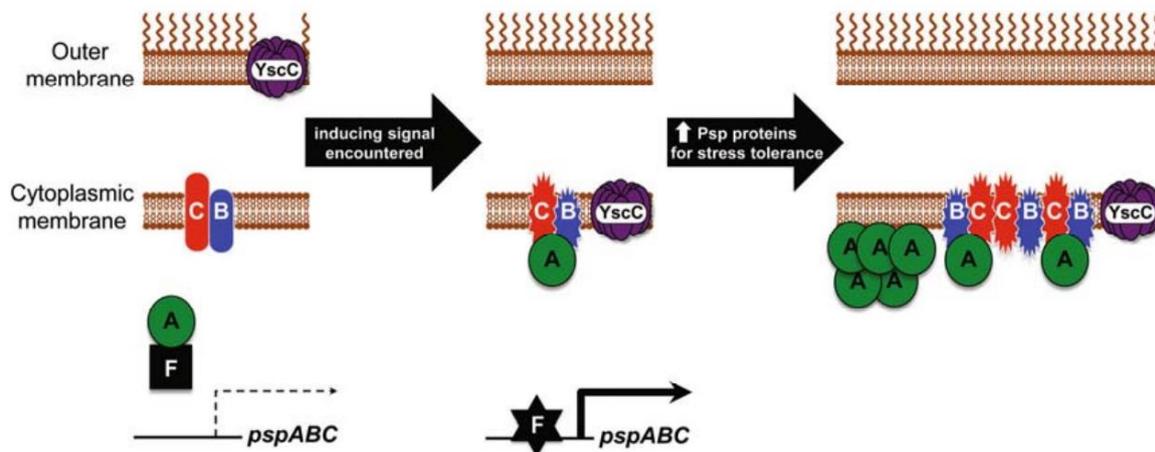


Figure 66 | La réponse Psp chez *Y. enterocolitica*.

À l'état non induit, le complexe PspBC est situé à la membrane et est à l'état OFF. Dans le cytoplasme, PspA forme un complexe avec PspF. En condition de stress induit par exemple par une mauvaise localisation de la sécrétine (YscC), le complexe PspBC est à l'état ON, permettant l'interaction avec PspA. PspF libérée active l'expression de l'opéron *pspABCDycjXF*. L'augmentation de la concentration de PspABC prévient les dommages à la membrane (S. Yamaguchi & Darwin, 2012).

Tous les systèmes Psp décrits jusqu'à présent possèdent deux points communs. Le plus évident concerne la présence universelle de la protéine PspA localisée à la périphérie de la membrane lorsque le système est induit. Le second concerne la présence d'une ou de plusieurs protéines membranaires impliquées dans le recrutement de PspA à la membrane.

La distinction majeure entre tous ces systèmes concerne leur régulation. Chez *E. coli* et *Y. enterocolitica*, les protéines PspA établissent une interaction directe avec l'activateur transcriptionnel PspF dont son gène est présent ailleurs dans le génome. La régulation s'effectue *via* un changement de partenaire. Chez *B. subtilis*, la régulation s'effectue par les activités phosphatases et kinases du système à deux composants LiaSR. Enfin, la régulation du système de *M. tuberculosis* est la plus complexe car elle couple ces deux mécanismes de régulation.

- **Proposition de régulation du système BAC de *P. aeruginosa* :**

Une hypothèse sur la régulation du système BAC a été émise lors des travaux réalisés sur BacA (cf Projet de recherche - Partie 1 – Section II.). BacA pourrait participer à un mécanisme de régulation *via* des interactions protéines-protéines. Ces interactions pourraient par exemple séquestrer un activateur de la transcription, qui est probablement encore inconnu à ce jour. En effet, d'après nos résultats, le système BAC ne contient pas de protéine ayant un rôle d'activateur de la transcription similaire à PspF par exemple.

Or, cet activateur est indispensable pour la transcription de l'opéron *bacABCDEF*. En effet, cet opéron semble sous la dépendance du facteur sigma σ^{54} . L'holoenzyme formée par l'ARN polymérase et le facteur sigma σ^{54} forme un complexe ouvert seulement en présence d'un activateur de la transcription. De plus, cet activateur de la transcription, grâce à son activité ATPase fournit l'énergie nécessaire à l'activation de la transcription. La protéine BacE prédite comme une ATPase pourrait donc être cet activateur, or, elle ne semble pas posséder les éléments structuraux communs aux activateurs connus pour interagir avec le facteur sigma σ^{54} . De plus, elle possède un domaine DUF3686 qui n'a, à ce jour, jamais été décrit en interaction avec le facteur sigma σ^{54} . En revanche, à l'image de *pspF*, il est possible que le gène codant l'activateur de la transcription soit ailleurs dans le génome.

De plus, Brennic et collaborateurs ont identifié en 2009 chez la souche PAK de *P. aeruginosa* de nouvelles cibles du système à deux composants GacA/ GaS faisant intervenir le régulateur traductionnel RsmA et les petits ARNnc RsmY/Z. Ce système a été abordé dans la partie bibliographique (cf Revue bibliographique – Chapitre 2 – Section I.4). Parmi ces cibles, se trouve l'opéron *pa3732-pa3728* (homologue de l'opéron *bac* chez PAO1). Cet opéron est surexprimé chez une souche déficiente pour le gène *rsmA* par rapport à la souche WT avec des rapports d'expression différentielles non négligeables allant de 4,9 à 16,9 (Brennic & Lory, 2009).

En se basant, sur ces différentes observations et sur nos travaux, nous proposons une hypothèse quant à la régulation de l'opéron *bac* **Figure 67**. Dans cette hypothèse, l'expression de l'opéron *bac* est régulée à deux niveaux. Le facteur sigma et l'activateur transcriptionnel, agissent à un niveau transcriptionnel tandis que la protéine RsmA serait le régulateur traductionnel du système. En conditions non inductrices, à l'image de PspF, BacA séquestrerait l'activateur de la transcription bloquant ainsi la transcription de l'opéron *bac*. En parallèle, RsmA, libre entrerait en compétition avec le ribosome en l'empêchant de se fixer sur le site de fixation au ribosome. En conditions inductrices, l'activateur de la transcription serait libéré par BacA et pourrait former l'holoenzyme constituée de l'ARN polymérase, du facteur sigma et de cet activateur. En parallèle, après un stimulus, l'histidine kinase GacS

s'autophosphorylerait et phosphorylerait à son tour le régulateur de réponse GacA. GacA phosphorylée activerait la transcription des gènes codant les ARNnc RsmY/RsmZ. Ces derniers en séquestrant RsmA libéreraient le site de fixation au ribosome permettant la traduction des protéines BAC.

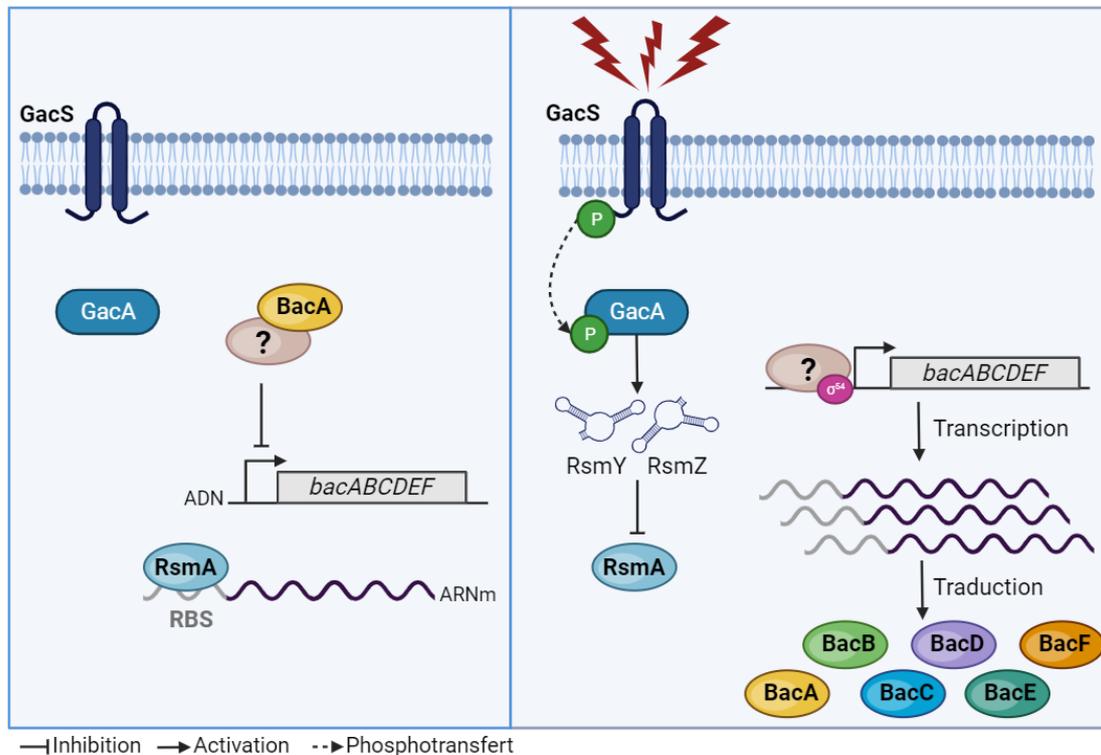


Figure 67 | Hypothèse sur la régulation de l'opéron bac.

En conditions non inductrices, BacA séquestre l'activateur de la transcription (encore inconnu et représenté par « ? ») bloquant ainsi la transcription de l'opéron *bac*. En parallèle, RsmA est libre et empêche la traduction en se fixant au site de fixation au ribosome (RBS). En conditions inductrices, l'activateur de la transcription, libéré par BacA, active la transcription de l'opéron *bac*. En parallèle, après réception du stimulus, l'histidine kinase GacS s'autophosphoryle et phosphoryle à son tour le régulateur de réponse GacA. GacA phosphorylée active la transcription des gènes codant les ARNnc RsmY/RsmZ qui séquestrent RsmA, libérant aussi le site de fixation au ribosome.

Cette proposition de régulation est à considérer avec prudence et des travaux supplémentaires devront évidemment être menés afin de mieux comprendre la régulation du système *bac* et d'identifier l'ensemble des acteurs qui y participent.

La partie 3 ci-après décrit les premières études visant à confirmer ou infirmer nos hypothèses fonctionnelles sur BacB et BacD.

Partie 3 :
Explorations
préliminaires des
protéines BacB
et BacD

Chapitre 1 : La protéine BacB

I. Contexte et objectifs de l'étude

Les membres de la famille PspA/IM30 sont connus pour former des structures en forme d'anneau grâce à leur capacité d'oligomérisation. La région coiled-coil est cruciale pour la formation de ses structures. En tant qu'homologue structural, il est fort probable que BacB possède aussi ces capacités d'oligomérisation. Pour vérifier cette hypothèse, un essai de purification de la protéine BacB a été mené dans le but de résoudre sa structure.

La protéine BacB a été produite grâce dans la souche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Cette souche de surexpression a été construite par le Dr. Virginie Molle (UMR 50235, Montpellier) dans le cadre de précédents travaux (Ben Mlouka, 2014). Le gène *pa3731* (homologue de *PA14_16150* chez PAO1) a été cloné dans le vecteur plasmidique pET et sa transcription a été placée sous la dépendance d'un promoteur T7 inductible à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

Les étapes d'induction à l'IPTG et d'extraction des protéines ont nécessité des étapes d'optimisation. Face aux difficultés rencontrées, différentes approches ont été testées c'est pourquoi cette partie sera abordée comme une partie « matériel et méthode » incluant les résultats.

Au terme de l'induction, la protéine (par la suite appelée BacB_{6His}) contient à son extrémité N-terminale une étiquette 6-Histidines (6His) et un site de clivage à la thrombine permettant de retirer cette étiquette 6His.

L'étiquette 6His permet de réaliser une purification selon la méthode de chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés ou IMAC. L'histidine peut se comporter comme un donneur d'électron et se lier de façon réversible à des ions métalliques. La purification IMAC se base sur cette propriété en utilisant les ions métalliques Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ ou Zn²⁺ pour créer une liaison forte avec l'étiquette 6His. Le nickel et le cobalt sont ceux qui présentent la plus forte affinité.

En parallèle, des études phénotypiques sur la souche $\Delta bacB$ ont été réalisées. Étant donné que de nombreuses données phénotypiques sont disponibles grâce aux précédentes études et en considérant le rôle de PspA, l'étude de la survie du mutant $\Delta bacB$ en condition de stress a été privilégiée.

II. Résultats

II.1 Purification de la protéine BacB_{6His}

II.1.1 Vérification de l'induction à l'IPTG

L'induction de l'expression du gène *pa3731* par l'IPTG a d'abord été vérifiée. Dans cette étape de vérification, aucune purification n'a été menée, c'est pourquoi l'extraction des protéines a été réalisée en condition dénaturante.

Un erlenmeyer contenant 100 mL de LB (supplémenté avec 100 µg/mL de carbénicilline) estensemencé à une absorbance de 600 nm (A_{600}) de 0,01 (10^6 UFC/mL) et placé sous agitation à 37°C. Lorsque l' A_{600} atteint 0,6, 1 mM d'IPTG est ajouté et la culture est de nouveau placée sous agitation à 37°C pendant 3 h. L'extraction des protéines totales, le dosage de Bradford et la migration sur gel SDS-PAGE 12,5% ont été réalisés selon les protocoles décrits dans la partie Matériel et Méthode - Sections VI.1.1, VI.2 et VI.3.

En condition inductrice (avec IPTG), nous observons une bande protéique majoritaire située entre 29 et 36 kDa (**Figure 68a**). Pour confirmer l'identité de cette protéine, la bande a été excisée, la protéine digérée à la trypsine et les peptides identifiés par spectrométrie de masse (cf Matériel et Méthode – Sections VI.3.5 et VI.4). Au terme de l'analyse, BacB_{6His} a été identifiée avec 40 peptides uniques (données non présentées) couvrant ainsi 93,07% de la séquence en acides aminés de BacB (**Figure 68b**).

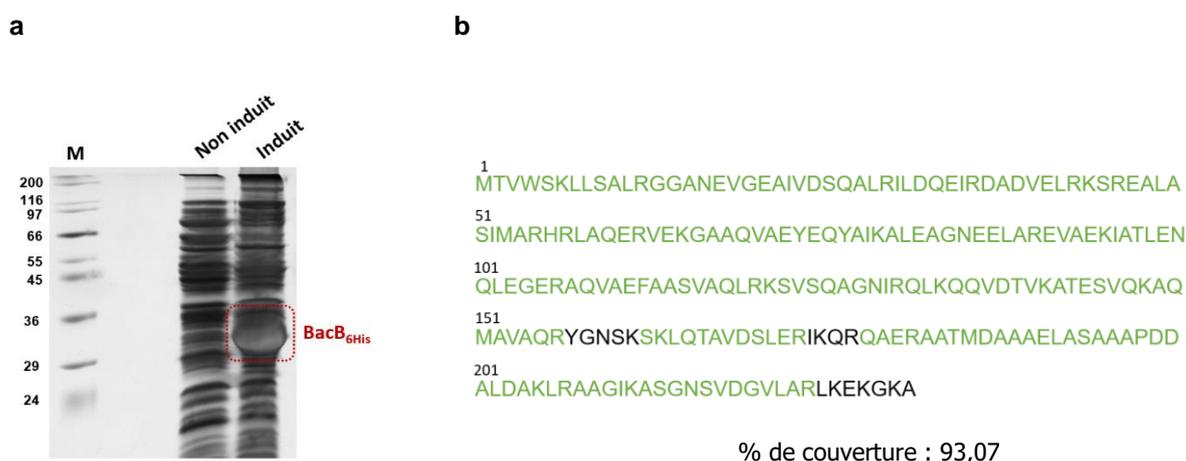


Figure 68 | Validation de l'induction par l'IPTG.

Profil électrophorétique des protéines solubles extraites en condition non induite ou induite par l'IPTG (**a**). Région de la protéine BacB identifiée (en vert) par spectrométrie de masse suite à l'excision d'une bande d'intérêt (encadrée en rouge) (**b**). M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

La surproduction de BacB_{6His} a donc été validée.

L'objectif de cette purification est d'élucider la structure de BacB par cristallographie. Pour conserver la structure native de la protéine, l'extraction des protéines a été réalisée en condition non dénaturante. Dans ces conditions, nous avons rencontré des difficultés à extraire la protéine BacB_{6His}, nécessitant l'optimisation du protocole expérimental.

II.1.2 Optimisation du protocole de purification de BacB_{6His} en condition native

II.1.2.1 Méthodes N°1

Les conditions de culture et d'induction restent inchangées. L'extraction des protéines est effectuée dans du tampon Tris HCl 20 mM (pH 7,4) NaCl 150 mM. L'extrait protéique est dosé puis mis à migrer sur un gel SDS-PAGE 12,5% (cf. Matériels et Méthodes - Sections VI.1.3 et VI.1.4). En parallèle, une extraction avec un tampon « maison » appelé R2D2 qui possède une forte capacité de solubilisation est effectuée ; elle servira de témoin positif (la composition de ce tampon maison est indiquée dans la partie Matériel et Méthode – Section VI.1.1).

Comme le montre la **Figure 69**, en condition inductrice, avec le tampon tris aucune bande protéique de forte intensité pouvant correspond à BacB_{6His} n'est visible dans la fraction protéique soluble.

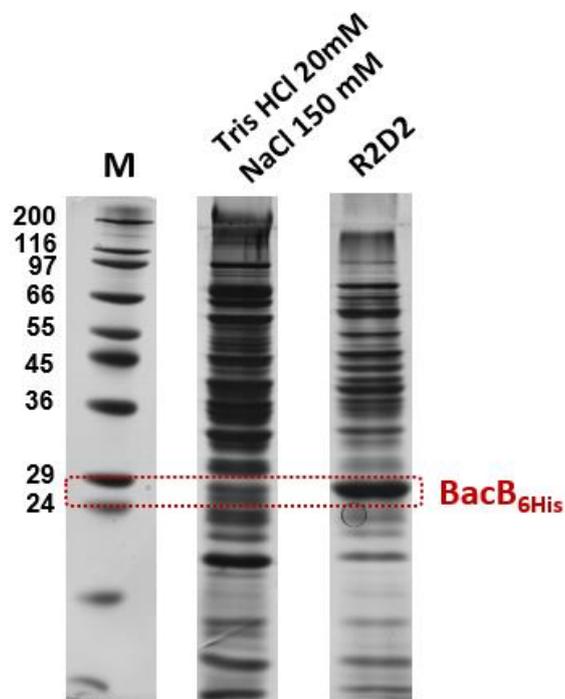


Figure 69 | Profil électrophorétique des protéines solubles extraites en condition inductrice selon la méthode 1.

La localisation de BacB_{6His} est indiquée par le rectangle rouge. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

La protéine BacB_{6His} ne se trouvant pas dans la fraction soluble, les culots obtenus après la centrifugation qui succède à la sonication ont été analysés. Ces culots contiennent les débris cellulaires issus de la lyse et la fraction protéique insoluble qui peut parfois se trouver sous forme de corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion se forment lorsqu'une trop grande quantité de protéine d'intérêt est produite ce qui engendre son accumulation en agrégats insolubles. Ces corps d'inclusion sont très difficiles à solubiliser, en particulier dans des tampons non dénaturants.

Pour vérifier la présence de BacB_{6His} dans ces culots, ces derniers ont été resuspendus dans un tampon Tris HCl 20 mM (pH 7,4) NaCl 150 mM ou dans le tampon R2D2. La suspension est ensuite soniquée puis centrifugée à 12 000 x g pendant 30 min à 4°C. L'extrait protéique est dosé et déposé sur un gel SDS-PAGE 12,5% (cf Matériel et Méthode - Sections VI.2 et VI.3).

Comme le montre la **Figure 70**, le tampon R2D2 parvient à solubiliser la protéine BacB contrairement au tampon Tris 20 mM HCl 150 mM NaCl. Ce résultat confirme la présence de BacB dans les corps d'inclusion.

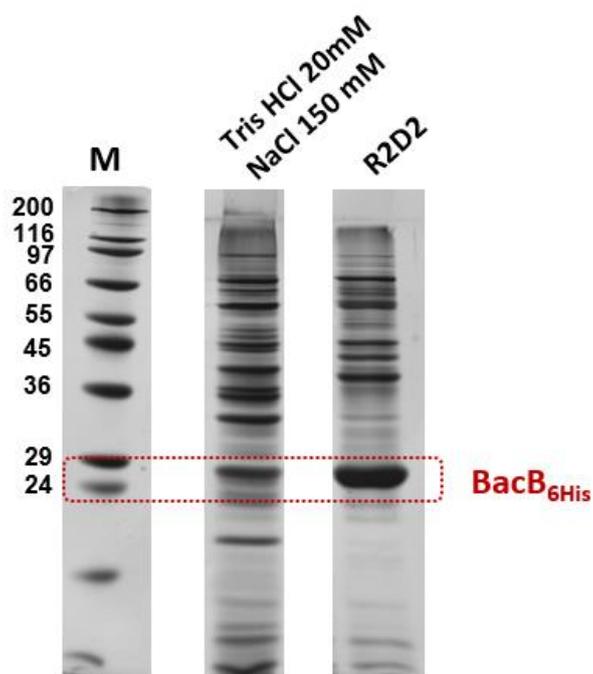


Figure 70 | Profil électrophorétique des protéines insolubles extraites en condition inductrice selon la méthode 1.

La localisation de BacB_{6His} est indiquée par le rectangle rouge. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

Cette observation indique que les conditions d'induction ne sont pas optimales pour la production de BacB_{6His}. De plus, la protéine BacB_{6His} forme des agrégats difficiles à solubiliser. En sachant qu'une production excessive de BacB_{6His} entraîne inévitablement la

formation d'agrégats, un nouveau tampon, des nouvelles conditions de culture, et d'induction ont été testés.

II.1.2.2 Méthode N°2

Dans cette méthode, trois températures d'induction ont été testées avec une diminution concomitante de la concentration en IPTG.

Brièvement, une culture en milieu LB est réalisée comme décrit précédemment. L'induction est effectuée lorsque l' A_{600} atteint 0,8 par ajout d'IPTG (0,5 mM) sur la nuit aux températures de 30°C, 20°C ou 16°C et sous agitation. L'extraction des protéines est effectuée dans du tampon Tris HCl 50mM (pH 7.4), 300 mM de NaCl, 10% de glycérol (v/v) et 10 mM d'imidazole. Les culots obtenus après sonication et centrifugation n'ont pas été traités. Les extraits protéiques solubles sont dosés et déposés sur un gel SDS-PAGE 12,5% (cf Matériel et Méthode - Sections VI.2 et VI.3).

Une bande protéique apparaît dans la zone de masse compatible avec BacB_{6His} (**Figure 71**). On remarque une augmentation de l'intensité de cette bande avec la température.

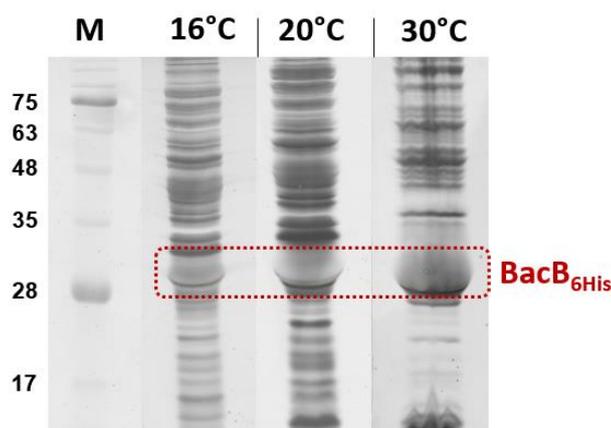


Figure 71 | Profil électrophorétique des protéines solubles extraites selon la méthode 2.

La localisation de BacB_{6His} est indiquée par les rectangles rouges. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

Si cette bande correspond bien à BacB_{6His}, on peut considérer que la quantité de protéines retrouvée dans la fraction soluble est acceptable. La diminution de la température d'induction et de la concentration en IPTG ont donc permis de minimiser la formation des corps d'inclusion.

Afin d'optimiser le protocole une dernière méthode a été testée en modifiant cette fois le milieu de culture.

II.1.2.3 Méthode N°3

Dans cette dernière méthode, le milieu LB a été remplacé par le milieu de culture TB (terrific broth, Sigma-Aldrich). Ce milieu riche est adapté à la culture d'*E. coli* et est notamment recommandé en vue d'une purification de plasmides ou de protéines recombinantes.

En dehors du milieu de culture, cette méthode utilise les mêmes conditions expérimentales que la méthode N°2, en particulier l'induction a été réalisée à 16°C, 20°C ou 30°C.

La température d'induction de 16°C ne favorise pas la production de BacB_{6His}. À une température de 20°C, une bande correspondant à BacB_{6His} est visible mais avec une intensité plus faible que la bande protéique obtenue avec le milieu LB. Enfin, à 30°C, la quantité obtenue en milieux LB et TB est similaire (**Figure 72**).

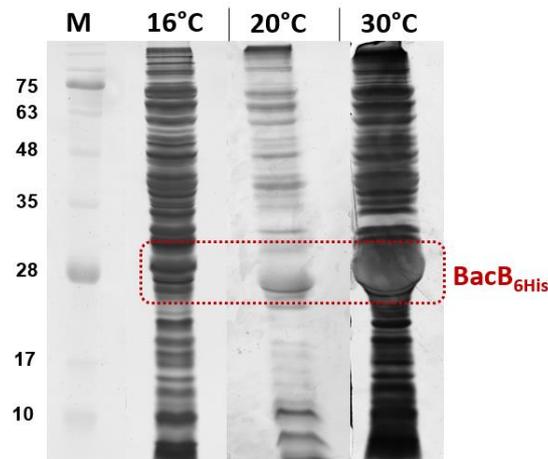


Figure 72 | Profil électrophorétique des protéines solubles extraites selon la méthode 3.

La localisation de BacB_{6His} est indiquée par les rectangles rouges. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

Les deux dernières méthodes semblent fournir une quantité de BacB_{6His} acceptable. Avant de mener cette purification, la présence de l'étiquette 6His a été vérifiée par Western Blot.

II.1.3 Confirmation de la présence de BacB_{6His} par Western Blot

À partir des extraits protéiques obtenus selon la méthode N°2, un Western Blot a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-6His (réalisé en collaboration avec le Dr. Christophe Arnoult, Laboratoire PBS).

Comme le montre la **Figure 73**, une bande très intense et peu de fixation non spécifique sont observées à partir de l'extrait protéique total provenant d'une culture induite en milieu LB à 30°C. Dans les autres conditions, cette bande de forte intensité est aussi visible mais, les bandes non spécifiques sont plus nombreuses, en particulier au niveau des bas poids moléculaires.

On remarque également la présence d'une bande intense au niveau des hauts poids moléculaires. Une masse moléculaire inférieure à 70 kDa, est observée ce qui laisse envisager la présence d'un dimère de BacB_{6His}.

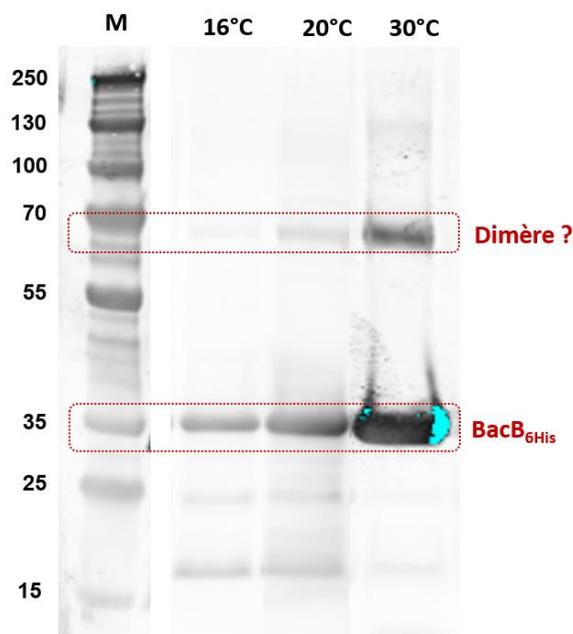


Figure 73 | Détection de la protéine BacB_{6His} par Western Blot dans les extraits protéiques obtenus selon la méthode d'extraction 2.

Les localisations de BacB_{6His} et des supposés dimères sont indiqués par les rectangles rouges. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

La protéine BacB_{6His} est bien présente dans les échantillons.

II.1.4 Essai de purification de la protéine BacB_{6His}

La culture a été réalisée à partir de 2 L de milieu LB et à 37°C jusqu'à atteindre une A₆₀₀ de 0,8. L'induction par l'IPTG est ensuite réalisée à une concentration de 0,5 mM sur la nuit à une température de 30°C. Les protéines sont extraites à l'aide du tampon Tris 50 mM HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10% de glycérol (v/v) et 10 mM d'imidazole et les extraits protéiques sont dosés et déposés sur un gel SDS-PAGE 12,5% (cf. Matériel et Méthode - Sections VI.1.1, VI.2 et VI.3).

La purification a été effectuée selon le principe d'IMAC en utilisant une résine greffée avec des ions Ni²⁺ (**Figure 74**). L'extrait protéique contenant toutes les protéines non retenues sur les billes est récupéré dans un premier temps. Cet échantillon est très complexe car il contient toutes les protéines non retenues sur les billes, soit pratiquement la totalité. Les lavages effectués avec des concentrations croissantes d'imidazole permettent ensuite de décrocher les protéines liées de façon non spécifique à la résine. L'éluat, quant à elle, a été réalisée avec une forte concentration en imidazole (0,5 M) et l'éluat est collecté en plusieurs fractions.

La protéine BacB_{6His} est présente dans chacune des fractions éluées. Les fractions sont de bonne qualité car elles sont très peu contaminées, à l'exception de la fraction F1 qui contient quelques contaminants de hauts poids moléculaires.

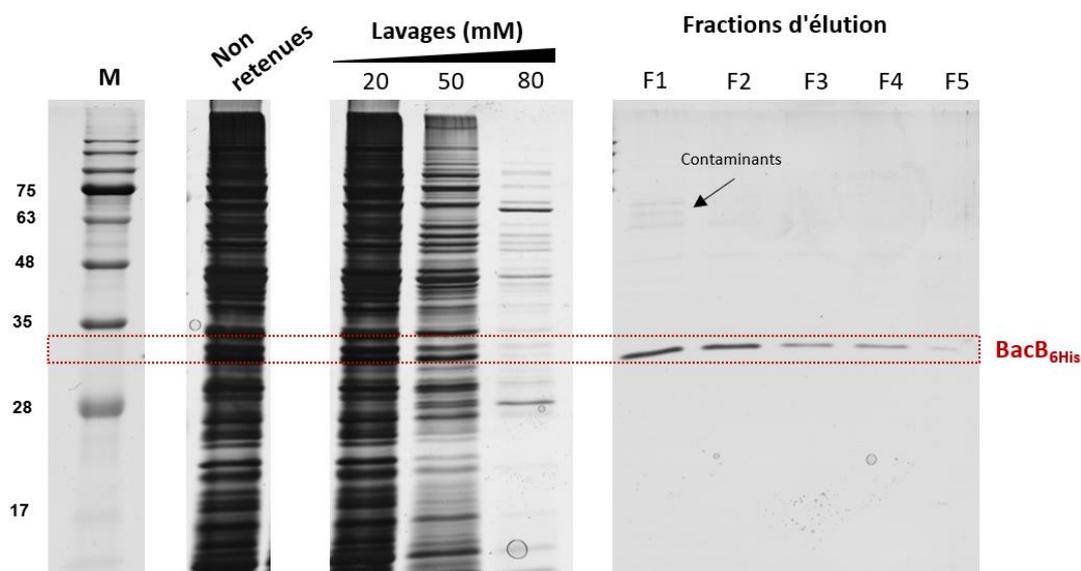


Figure 74 | Profil électrophorétique de la purification de BacB_{6His}.

La localisation de BacB_{6His} est indiquée par le rectangle rouge. M : marqueur de poids moléculaire (kDa).

D'après l'intensité des bandes de la fraction 1 et 2, BacB_{6His} y est présente en faible quantité. D'après le dosage effectué sur ces fractions, la concentration moyenne de BacB_{6His} est d'environ 24 µg/mL, ce qui conduit à une quantité d'environ 12 µg/fraction.

Cette quantité, obtenue à partir de 2 L de culture, est trop faible pour mener une étude cristallographique.

Les prérequis pour l'obtention d'un cristal de bonne qualité sont en effet : *i)* une quantité suffisante de protéine, *ii)* une pureté supérieure ou égale à 95% et *iii)* un repliement correct de la protéine. Dans notre cas, la quantité obtenue n'est malheureusement pas suffisante. En revanche la pureté est correcte mais peut encore être améliorée en augmentant les volumes de lavages et les concentrations en imidazole, tout en veillant à ne pas décrocher la protéine d'intérêt.

II.1.5 Conclusion

Les conditions sélectionnées lors de l'étape d'optimisation du protocole d'extraction protéique nous ont permis de purifier BacB_{6His}. Cependant, la quantité obtenue est trop faible pour envisager une étude structurale par cristallographie et ce même avec un volume important de culture. L'extrait protéique reste de bonne qualité malgré la présence de quelques contaminants en très faible quantité. Une optimisation du protocole doit donc se poursuivre pour surtout améliorer le rendement final et la pureté de BacB_{6His}, tout en conservant son bon repliement et sa fonction.

Les difficultés d'extraction de BacB sont liées à sa faible solubilité. Cette solubilité peut être améliorée à l'aide d'un détergent. Dans cette optique, des essais ont été réalisés avec le kit « Analytic Extractor Kit » (Anatrace) qui contient 11 détergents différents. D'après les premiers résultats, le détergent FOS-CHOLINE®-12 semble favoriser la solubilité de BacB_{6His}. Une optimisation du protocole en incorporant ce détergent est envisagée pour les futurs essais de purification.

Enfin, l'observation d'un probable dimère de BacB sur le Western Blot confirme que BacB possède bien des propriétés d'oligomérisation. Comme Vipp1 et PspA, ces dimères formés par BacB pourrait être les « blocs de construction » minimums pour permettre la formation de structures plus imposantes en forme d'anneau ou de tige.

II.2 Études phénotypiques

II.2.1 Contrôle du mutant $\Delta bacB$

Avant de réaliser les différents tests phénotypiques, l'insertion du transposon dans le gène PA14_16150 a été vérifiée (**Figure 75a**).

L'autre vérification concerne la croissance de $\Delta bacB$. Pour garantir l'interprétation des résultats, il faut d'abord s'assurer que le transposon n'affecte pas la croissance du mutant. D'après la **Figure 75b**, la croissance de $\Delta bacB$ est identique à celle de la souche WT et ce sur 48 h de culture.

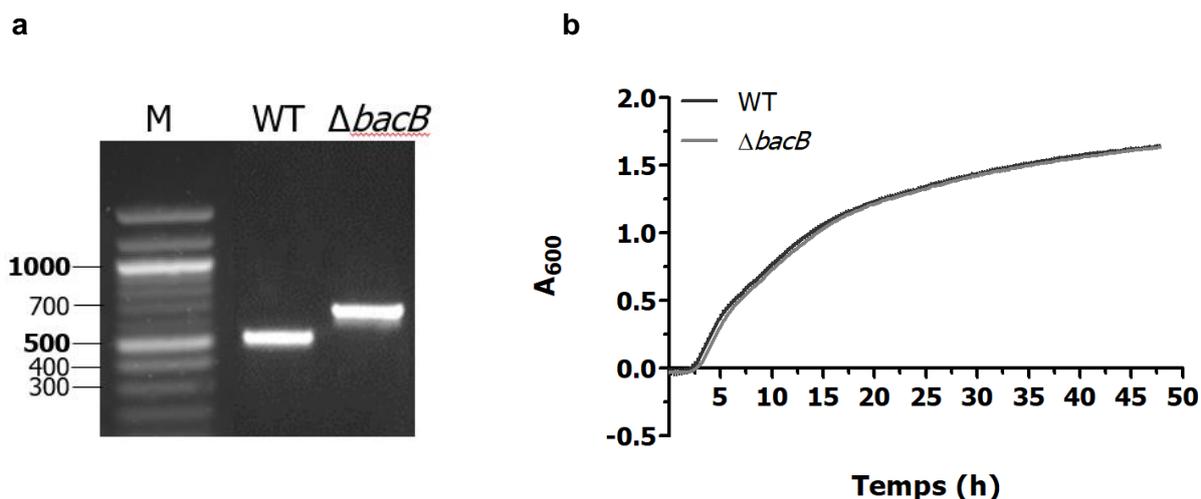


Figure 75 | Études préliminaires réalisées sur la souche $\Delta bacB$.

Vérification de l'insertion du transposon par PCR. M : marqueur de poids moléculaires, piste 1 : gène *PA14_16150* sauvage, piste 2 : gène *PA14_16150* contenant le transposon (a). Croissance de la souche WT et $\Delta bacB$ en milieu LB à 37°C pendant 48 h (b).

II.2.2 Étude de la survie du mutant $\Delta bacB$

La réponse Psp la mieux décrite concerne de façon logique celle d'*E. coli*. La protéine PspA fût la première identifiée il y a environ 30 ans par les collaborateurs de Peter Model (Brissette et al., 1990). Elle a été nommée ainsi, suite à son accumulation lors d'une infection par des phages filamenteux. Par la suite des stress comme un pH élevé (9), la mauvaise localisation des protéines membranaires, le choc chaud, les fortes osmolarités, un choc à l'éthanol, l'inhibition de la synthèse des lipides et l'ajout de protons ionophores ont été identifiés comme des inducteurs du système Psp d'*E. coli*.

Les systèmes Psp de *Vibrio cholerae* et de *Streptomyces lividans* sont induits par les mêmes conditions que celles induisant le système Psp d'*E. coli*. Chez *S. lividans*, la protéine PspA ne fait pas partie d'un système. Elle est induite en fin de phase stationnaire de croissance et en condition de stress variés : lors d'un choc osmotique, à l'éthanol, alcalin, chaud, au contact de la bacitracine et du SDS (Vrancken et al., 2008). Concernant *V. cholerae* son système Psp est fortement similaire à celui d'*E. coli*. Il est formé par PspA, PspB, PspC, PspF et PspG et le mécanisme de régulation est identique à celui d'*E. coli*. Son système est induit en fin de phase stationnaire, suite à un choc chaud, à un traitement SDS, à un choc osmotique et à un choc à l'éthanol (DeAngelis et al., 2019).

Quelques-unes de ces conditions ont été testées sur le mutant $\Delta bacB$ afin de comparer sa capacité de survie par rapport à la souche WT. Les conditions présentées sont toutes source de stress d'enveloppe qui peuvent induire un ralentissement de la synthèse des composants membranaires, un repliement protéique incorrecte, une diminution ou une augmentation de la fluidité membranaire, une perturbation du potentiel membranaire ou encore une altération des lipides. Les concentrations de chacune des molécules testées ont été choisies en accord avec les données disponibles dans la littérature. Les courbes de croissances effectuées en présence de SDS et de peroxyde d'hydrogène ne sont pas représentées en raison d'un manque de reproductibilité entre les réplicats biologiques.

Dans un milieu de culture LB à pH 9, aucune différence de croissance n'est observée entre les deux souches (

Figure 76).

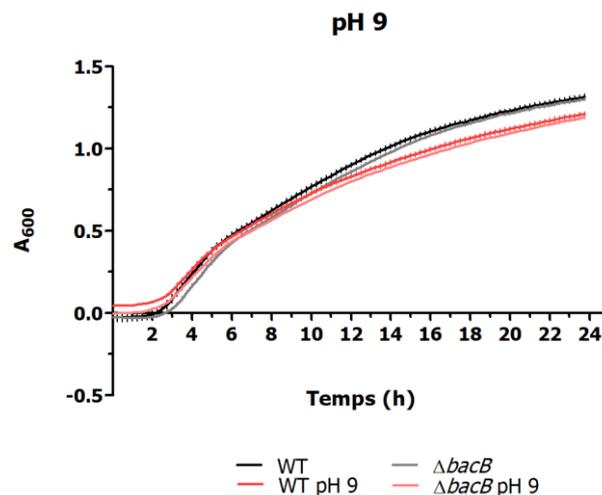


Figure 76 | Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture à pH 9.

Le choc osmotique est induit par l'ajout de NaCl dans le milieu de culture en début de croissance (courbes de gauche) ou en milieu de phase exponentielle (courbes de droite).

La croissance des souches WT et $\Delta bacB$ est impactée de façon identique en condition de forte osmolarité (Figure 77). L'ajout de NaCl en début de croissance induit un allongement de la durée de la phase de latence tandis qu'en milieu de phase exponentielle un ralentissement de croissance est observé. Des résultats identiques ont été obtenus avec le sucrose (données non présentées).

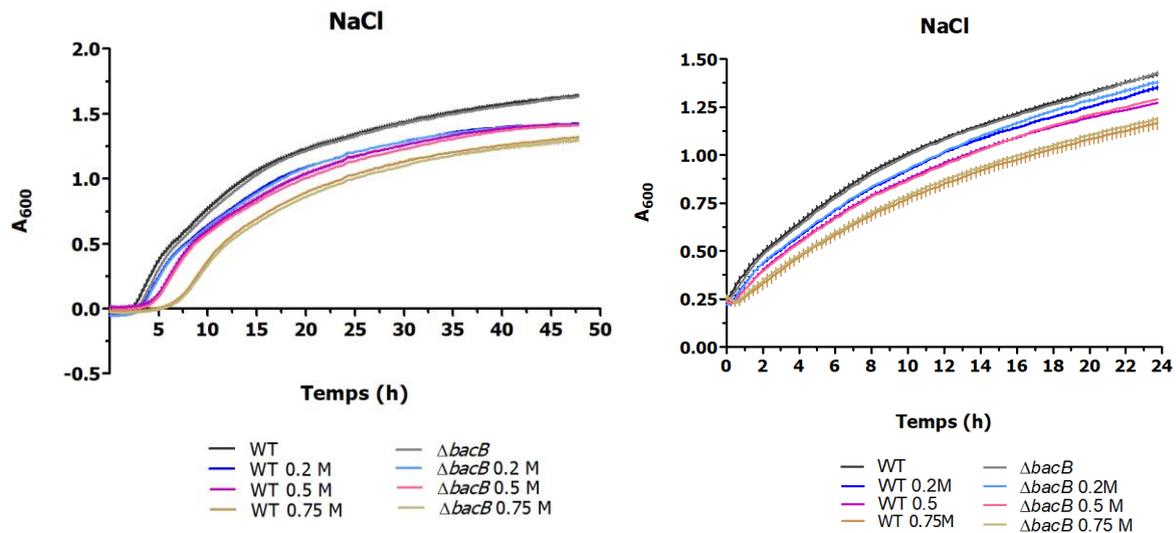


Figure 77 | Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture hyperosmotique. Le stress est ajouté en début de croissance (gauche) ou en milieu de phase exponentielle (droite).

Le choc alcalin a été réalisé en présence de NaOH, ajouté en début de phase de croissance (courbes de gauche, **Figure 78**). L'ajout de 10 mM de NaOH ne modifie pas les premières étapes de croissance mais provoque une baisse de la densité cellulaire en début de phase stationnaire chez les souches WT et $\Delta bacB$. L'ajout d'une concentration de 30 mM de NaOH, induit un fort allongement de la phase de latence et une diminution de la densité cellulaire chez les deux souches. L'ajout de 30 mM de NaOH en milieu de phase d'exponentielle provoque un arrêt de la croissance d'environ deux heures avant une reprise de celle-ci. Cet arrêt de croissance est plus prononcé chez la souche $\Delta bacB$ mais après 24 h de culture, la même densité est observée entre les deux souches (courbes de droite).

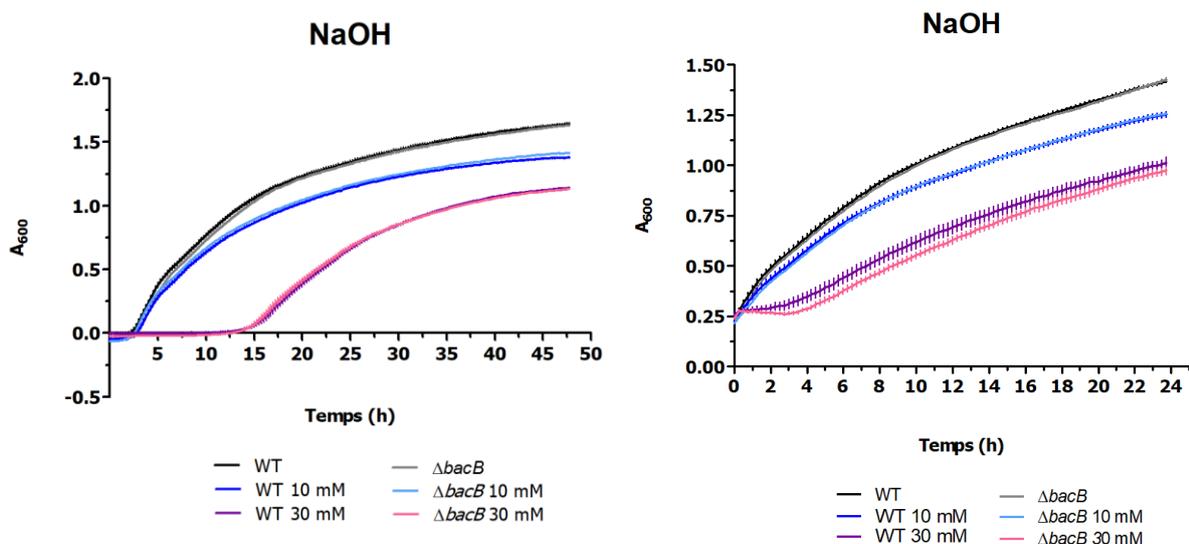


Figure 78 | Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture alcalin. Le stress est ajouté en début de croissance (gauche) ou en milieu de phase exponentielle (droite).

Concernant, le choc induit par l'éthanol, lorsque ce dernier est ajouté à la concentration de 1% dès le début de la culture, la densité cellulaire des souches WT et $\Delta bacB$ diminue (courbes de gauche, **Figure 79**). En présence de 2% d'éthanol, le mutant $\Delta bacB$ présente un retard de croissance durant toute la phase exponentielle comparée à la croissance du WT. En revanche, à 24 h, les densités cellulaires sont identiques dans les deux cultures.

Chez les souches WT et $\Delta bacB$, l'ajout d'éthanol au milieu de phase exponentielle induit un ralentissement de la croissance et en conséquence à une diminution de la densité cellulaire au bout de 48 h (courbes de droite).

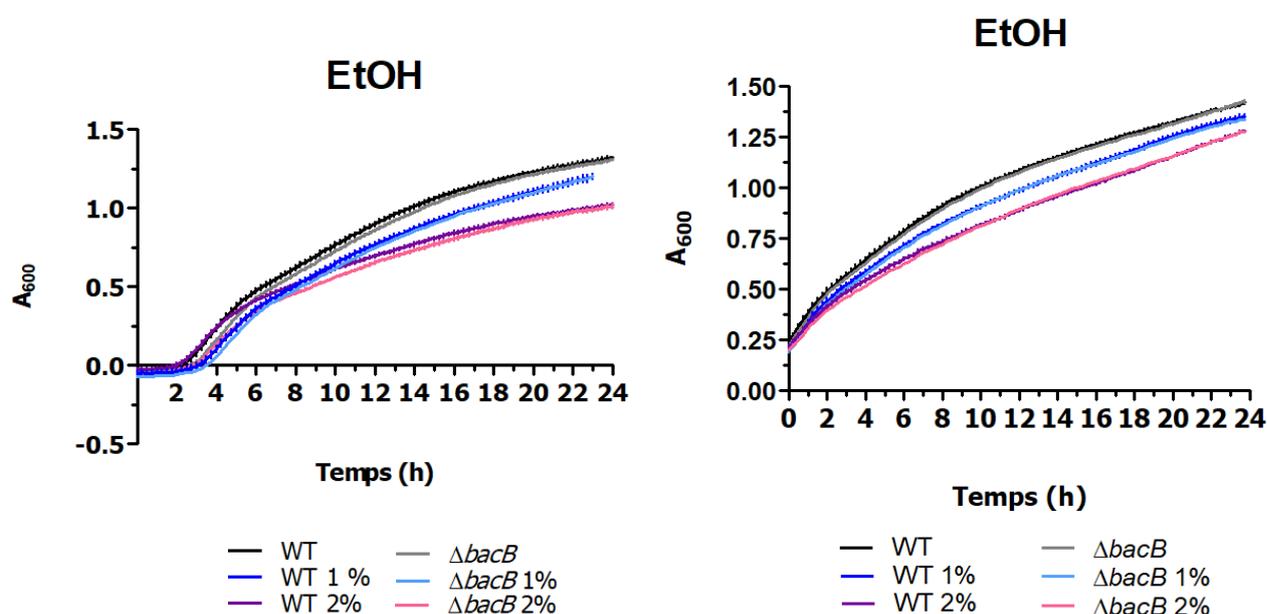


Figure 79 | Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu de culture en présence d'éthanol. Le stress est ajouté en début de croissance (gauche) ou en milieu de phase exponentielle (droite).

Face à ces différents stress d'enveloppe, la croissance de la souche $\Delta bacB$ n'étant pas ou très peu impactée, nous avons comparé la survie des souches WT et $\Delta bacB$ face à des doses létales (« killing assays ») de sucrose ou d' H_2O_2 .

La CMI de l' H_2O_2 réalisée par la méthode des microdilutions, est de 2 mM pour les souches WT et $\Delta bacB$. Une concentration de 100 mM a donc été utilisée pour réaliser l' H_2O_2 killing.

Les killing assays ont été réalisés en milieu de phase exponentielle de croissance, soit à une densité cellulaire d'environ 10^9 UFC/mL (**Figure 80**).

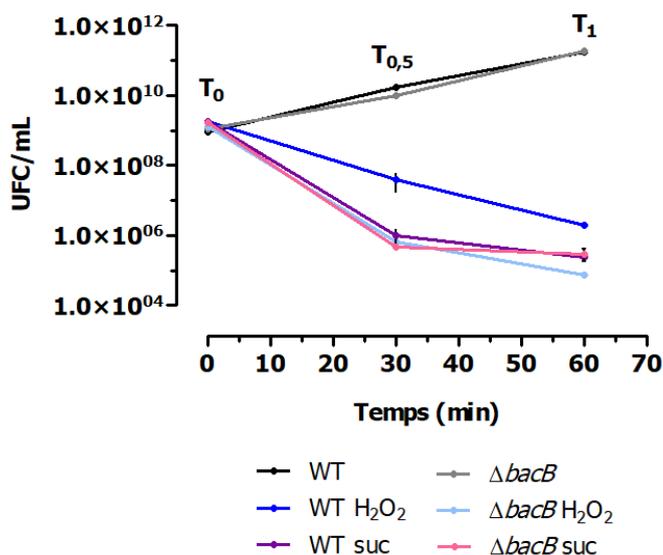


Figure 80 | Croissance des souches WT et $\Delta bacB$ en milieu fortement oxydatif ou osmotique.
Suc : sucrose

Après 30 min ($T_{0,5}$) d'exposition à l' H_2O_2 , la souche WT subit une perte de population d'environ 1,5 log tandis que cette perte s'élève à 3 log pour le mutant. Après 60 mins (T_1), cette perte s'accroît de 2 log pour la souche WT et 4 log pour le mutant.

Après 60 min (T_1) d'exposition sucrose, la souche WT et le mutant subissent une perte de population d'environ 3 log.

II.2.3 Conclusion et discussion

Compte-tenu de son homologie avec les membres de la famille PspA/IM30, nous avons supposé que BacB pouvait aussi jouer un rôle dans la protection de la membrane face aux stress d'enveloppe. Dans le but de confirmer cette hypothèse, plusieurs conditions de stress, connues pour induire les différents systèmes Psp décrits, ont été testées.

Les différents systèmes Psp sont induits à la suite de stress d'enveloppe très variés, dont certains se sont révélés communs aux différents systèmes. En effet, chez *E. coli*, *B. pseudomallei*, *V. cholerae* et *S. lividans*, la réponse Psp est induite en phase stationnaire, à la suite d'un choc à l'éthanol, osmotique, de température et au contact du SDS. Concernant *P. aeruginosa*, dans la grande majorité des stress, la mutation n'impacte pas sa survie. Un retard de croissance de la souche a été observé au moment de l'ajout du NaOH (30 mM) au milieu de la phase exponentielle ou de l'éthanol au début de la croissance. En revanche, après 24 h de croissance, la densité finale de $\Delta bacB$ est identique à celle du WT. En revanche, en milieu fortement oxydatif, délétère pour la bactérie, la mortalité est plus élevée chez $\Delta bacB$ comparée à celui du WT.

Des précédents travaux (Macé et al., 2008) ont montré que la protéine BacB est accumulée à la suite d'un choc osmotique induit par 20% de saccharose (v/v) ou 0,2 M NaCl. En revanche, BacB ne semble pas répondre à un changement brutal de température de 37°C à 50°C (Macé et al., 2008). L'absence d'effet du choc osmotique sur la croissance de $\Delta bacB$ peut s'expliquer par la présence de mécanismes de défense employés par *P. aeruginosa* pour survivre dans ces conditions. En présence de forte osmolarité, la cellule fait face à un déséquilibre homéostatique conduisant à une fuite d'eau hors de la cellule. Pour contre-balancer l'augmentation de la pression osmotique, *P. aeruginosa* accumule des osmoprotectants comme la glycine bêtaïne (un dérivé de la choline), le tréhalose ou encore le NAGGN (N-acetylglutaminyglutamine) (D'Souza-Ault et al., 1993), ce dernier étant l'osmoprotecteur majeur chez *P. aeruginosa*. En parallèle, une entrée rapide d'ions K⁺ ou d'anions inorganiques comme le glutamate permettent de faire baisser la pression osmotique. *P. aeruginosa* contient dans sa membrane des canaux mécanosensibles comme le MscL qui détectent les changements d'osmolarité. Ces osmosenseurs se présentent sous forme oligomérique et fonctionnent grâce à des transporteurs. La molécule à transporter, comme la glycine bêtaïne est prise en charge par le transporteur, qui subit un changement conformationnel entraînant le transfert de la molécule osmoprotectrice de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Aspedon et al., 2006; Bremer & Krämer, 2019; J. M. Wood, 1999).

Les études sur les systèmes Psp ont aussi montré que le défaut de localisation des sécrétines engendre spécifiquement et uniquement la réponse Psp chez *E. coli*, *V. cholerae* et *Y. enterocolitica* (DeAngelis et al., 2019; Lloyd et al., 2004; Model et al., 1997; S. Yamaguchi & Darwin, 2012). Les sécrétines sont des protéines capables de créer des pores dans la membrane. Ces pores sont très importants car ils permettent l'extrusion du filament phagique, la biogénèse des *pili* de type IV et des systèmes de sécrétion du type II et III (Genin & Boucher, 1994).

P. aeruginosa possède elle aussi des sécrétines dont XcpQ, PscC et PilQ qui sont les sécrétines respectives du SST2, du SST3 et des *pili* de type IV mais, étonnamment, aucune réponse au stress induit par le défaut de localisation de ces sécrétines n'a été observée. C'est dans ce contexte qu'en 2009, l'étude de Seo et collaborateurs a été menée sur *P. aeruginosa* afin d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans cette réponse. L'homologue de BacB, PA3731 chez PAO1 faisait partie des candidats testés dans cette étude mais son rôle dans la réponse au stress liée aux sécrétines n'a pas été mis en évidence. Cette étude suggère que c'est la protéine PA0943, prédite comme périplasmique, qui participerait à cette réponse en particulier avec la sécrétine XcpQ (Seo et al., 2009).

Le dernier point commun entre les différents systèmes Psp est l'implication de PspA dans l'export de protéines à travers les systèmes de sécrétion Sec et Tat. Ces systèmes ont été

évoqués dans la partie bibliographique (cf Revue bibliographique – Chapitre 1 – Section VII.2.1.2).

Les systèmes Sec et Tat sont situés dans la membrane interne et sont responsables de l'export de la plupart des protéines périplasmiques et des protéines de la membrane externe chez les bactéries Gram négatif, tandis qu'ils sont localisés dans la membrane cytoplasmique des Gram positif. Le processus de transport par le système Sec utilise une ATPase dont l'énergie libérée conduit la protéine dans le canal, la PMF (force protomotrice) prenant ensuite le relais pour l'export. Le système Tat utilise uniquement la PMF. Chez *S. lividans*, la surexpression de *pspA* augmente significativement la quantité de protéines sécrétées par Sec et Tat (Vrancken et al., 2007). Il arrive parfois que ces systèmes soient bloqués à cause d'une accumulation de protéines incorrectement repliées. Chez *E. coli*, PspA permet de « désaturer » le système Tat augmentant ainsi la quantité de protéines périplasmiques exportées par ce dernier. Lorsque *pspA* est mutée, la saturation du système Tat est exacerbée. Ce phénotype est restauré par Vipp1, l'homologue de PspA chez les cyanobactéries et les plantes (DeLisa et al., 2004). Enfin, le système Psp est induit chez une souche *E. coli* privée de son système Tat (DeLisa et al., 2004). Récemment, une induction du système Tat dépendante du système Psp a été mise en évidence à la suite de l'exposition de *S. typhimurium* aux sels biliaires (Rogers et al., 2022). L'implication du système Psp dans l'export des protéines par le système Tat a aussi été montré chez *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *B. subtilis* (Bernal-Cabas et al., 2020; Darwin, 2007; Tidhar et al., 2019).

Le point commun entre tous ces stimuli est leur impact sur la PMF, elle aussi inductrice du système Psp. La réponse Psp est activée en phase stationnaire, c'est-à-dire lorsque le métabolisme énergétique est au plus bas. Il est donc difficile de savoir qui active le système : est-ce les stress ou l'effet de ces stress sur la PMF ? Quelques éléments de réponse avancent l'hypothèse qu'une perturbation de la PMF n'est pas l'unique inducteur du système Psp. En effet, chez *E. coli*, une perturbation de la différence de potentiel membranaire ou du gradient de protons (deux mécanismes qui participent au maintien de la PMF) n'induit pas une réponse Psp. À l'inverse, une réponse Psp a été mise en évidence alors que la PMF était intacte (Flores-Kim & Darwin, 2016; Jovanovic et al., 2006).

Il semble aussi que chaque système Psp soit activé par des stimuli spécifiques. Par exemple, chez *B. subtilis*, l'opéron *liaIHGFSR*, contenant LiaH l'homologue de PspA, est fortement induit par des antibiotiques comme la bacitracine (système induit 500 fois plus qu'à l'état non induit), la vancomycine (63 fois plus), la nisine et le ramoplanine (420 fois plus) (Mascher et al., 2003, 2004). Ces quatre antibiotiques, interfèrent avec le cycle du lipide II, un précurseur utilisé dans la synthèse du peptidoglycane. Le système *liaIHGFSR* est aussi induit en présence de solvants organiques comme l'éther de diphenyle ou le cyclooctane (Mascher et al., 2004). Ces

solvants organiques s'accumulent au sein de la membrane et peuvent interférer indirectement avec le cycle du lipide II.

Chez *E. coli*, le système Psp est aussi induit par le lysozyme qui clive les liaisons entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine du peptidoglycane, ce qui n'est pas le cas du système Psp de *B. subtilis* (Mascher et al., 2004). Chez *B. pseudomallei*, le système Psp n'est pas induit lors d'un choc hyperosmotique à la différence des autres systèmes Psp. À noter tout de même que BPSL2105 pure forme de larges structures oligomériques similaires à celles formées par PspA, LiaH et Vipp1 (Southern et al., 2015).

Compte-tenu de ces différences, il est possible que le système BAC soit induit par d'autres stimuli encore inconnus à ce jour.

De façon intéressante, les systèmes Psp ne sont pas uniquement impliqués dans la réponse aux stress d'enveloppe. Ils sont aussi impliqués dans la virulence. Chez les bactéries intracellulaires *S. enterica*, *B. pseudomallei*, *M. tuberculosis*, *S. flexneri*, leur système Psp permet leur survie au sein des macrophages (Datta et al., 2015; Eriksson et al., 2003; Lucchini et al., 2005; Southern et al., 2015). Chez *B. pseudomallei*, une diminution du taux de survie est observée seulement lorsque les bactéries sont en phase stationnaire. En revanche, les différents essais de stress menés dans le but de mimer le stress induit par les macrophages n'ont pas réussi à expliquer les raisons de la diminution du taux de survie.

Le système Psp de *V. cholerae* est impliqué quant à lui dans la colonisation intestinale chez le modèle zebrafish (DeAngelis et al., 2019).

Chez *E. coli*, le système Psp est induit au cours de la formation de biofilms et une délétion du gène *pspF* réduit la formation de biofilm (Beloin et al., 2004). Enfin chez *Y. enterocolitica*, la délétion du gène *pspC* provoque une perte de virulence (Darwin & Miller, 1999).

Concernant *P. aeruginosa*, d'après les précédents travaux, la mutation de *PA14_16150* induit une diminution de la virulence et de la formation de biofilm. En détail, le mutant présente une très faible adhérence sur les cellules pneumocytaires A549, une diminution de la formation de biofilm qui s'accompagne d'une diminution de la sécrétion de rhamnolipides. Enfin, chez un modèle murin infecté par le mutant, la mortalité est plus faible que pour un modèle murin infecté par le WT au bout de 48 h (Ben Mlouka, 2014; Macé et al., 2008; Saffiedine, 2019; Seyer, 2006; Vilain et al., 2004).

Ainsi, ces différentes études reflètent la diversité fonctionnelle acquise au cours de l'évolution par les différents membres de la famille PspA/IM30.

Le meilleur exemple concerne la protéine Vipp1, qui a déjà été légèrement abordée durant l'étude bio-informatique sur BacB (cf Projet de recherche - Partie 2 – Section III.1). Vipp1, comme PspA possède un rôle dans la stabilisation et dans la protection de la membrane. La surexpression de Vipp1 protège *A. thaliana* d'un choc chaud (L. Zhang et al., 2016). En

revanche, Vipp1 possède une hélice supplémentaire dans son extrémité C-terminale. Cette hélice discrimine Vipp1 de PspA et semble être responsable de la fonction particulière acquise par Vipp1 au sein des thylakoïdes. En effet, des études ont démontré que : *i*) PspA était incapable d'effectuer la fonction de Vipp1 au niveau des thylakoïdes (Aseeva et al., 2004; Bultema et al., 2010; Vothknecht et al., 2012; Westphal et al., 2001) et *ii*) Vipp1 est capable de remplacer PspA chez une souche *E. coli* déficiente pour le gène *pspA* (DeLisa et al., 2004; L. Zhang et al., 2012). Ceci montre bien que Vipp1 possède des fonctions communes à PspA mais a aussi acquis une fonction bien spécifique au sein des thylakoïdes.

Cette fonction spécifique a été découverte récemment et concerne le remodelage de la membrane. Les organismes photosynthétiques dépendent de la lumière et ils doivent donc adapter leur processus de photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse. Il a été montré que la localisation de Vipp1 variait en fonction de l'exposition à la lumière. Lorsque la cellule est exposée à une faible ou à une forte luminosité, Vipp1 se situe respectivement à la membrane cytoplasmique ou à la membrane des thylakoïdes. Il faut noter que ces changements de localisation ont aussi été observés lorsque *A. thaliana* est exposée à un stress hypotonique, renforçant l'hypothèse du rôle protecteur de Vipp1. Lorsque Vipp1 est localisée à la membrane des thylakoïdes, ces dernières subissent de forts réarrangements. Des observations *in vivo* ont révélé que Vipp1 se fixe préférentiellement sur les lipides membranaires chargés négativement et était responsable de la fusion membranaire (Hennig et al., 2015; Thurotte & Schneider, 2019). Récemment, cette fusion membranaire a aussi été observée en condition de stress lorsque la cyanobactérie *Synechocystis* sp. subit une fuite de protons donc une chute de la PMF (Siebenaller et al., 2020). La même année, Junglas et collaborateurs ont proposé un mécanisme de protection membranaire impliquant Vipp1. Au moment du stress, Vipp1 interagirait avec les lipides chargés négativement sous forme de structures en anneau qui par la suite se désassemblent pour former un « tapis » formé de plus petits oligomères et monomères (Junglas et al., 2020) (**Figure 81**).

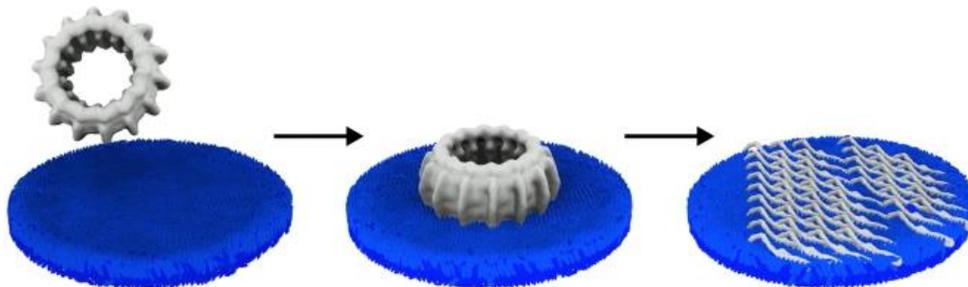


Figure 81 | Mécanisme de protection de la membrane par Vipp1.

La liaison de l'anneau IM30 à la surface membranaire chargée négativement entraîne son désassemblage et la formation de tapis permettant la stabilisation de la membrane (Junglas et al., 2020).

Des résultats similaires ont été observés chez PspA. En effet, PspA, se fixe à la périphérie de la membrane en privilégiant les lipides chargés négativement dans le but de bloquer la fuite de protons consécutive à un dommage membranaire (Jovanovic, Mehta, McDonald, et al., 2014; Kobayashi et al., 2007).

Ces capacités de fusion membranaire sont en réalité ancestrales. Trois études récentes ont en effet démontré que PspA et Vipp1 font en fait partie de la même famille que le complexe ESCRT-III, en tant que protéines impliquées dans le remodelage de la membrane (Gupta et al., 2021; Junglas et al., 2021; J. Liu et al., 2021). ESCRT-III a été légèrement abordée durant l'analyse bio-informatique de BacE supposée être une ATPase AAA+ (cf Projet de recherche – Partie 2 – Section III.3). Les informations citées ci-dessous proviennent des revues suivantes (Hurley, 2015; McCullough et al., 2018; McCullough & Sundquist, 2020; Migliano et al., 2022; Olmos, 2022; Vietri et al., 2020).

Le remodelage membranaire est crucial pour la viabilité des cellules. La membrane des cellules eucaryotes est extrêmement dynamique par le biais de phénomènes de remodelage, de fusion, de bourgeonnement et de fission. L'ESCRT en tant qu'acteur clés de ces phénomènes, est impliqué dans de nombreux processus biologiques : *i*) la formation de corps multivasculaires de l'endosome, *ii*) le bourgeonnement de la membrane pour la libération des virus, *iii*) l'abscission qui est la dernière étape de la division cellulaire, *iv*) la surveillance et la reformation de l'enveloppe nucléaire, *v*) la formation de l'autophagosome impliqué dans l'autophagie, *vi*) la réparation de la membrane plasmique et celle du lysosome. L'ESCRT a été découvert chez les Archées et est universellement retrouvé chez les eucaryotes. Il se compose de 4 complexes multimériques (ESCRT-0, -I, -II, -III), de protéines accessoires et de l'ATPase AAA+ Vps4 qui a d'ailleurs été évoquée dans l'étude bio-informatique de BacE. Ces différentes sous-unités sont cytoplasmiques et sont séquentiellement recrutées par des protéines membranaires au niveau d'un site spécifique à réparer ou remodeler par exemple. Toutes ces sous-unités ne sont pas indispensables à la fonction d'ESCRT, sauf ESCRT-III et Vps4. Chez l'Homme, le complexe ESCRT-III, regroupe les 12 protéines appelées CHMPs (charged multivascular body proteins) dont CHMP4, CHMP3 et CHMP2 qui sont les acteurs majeurs dans le remodelage de la membrane. Le complexe ESCRT-III est extrêmement flexible et adopte à la membrane une variété de conformations. La base structurale est un filament qui peut ensuite former des structures en anneaux, en spirales, en hélices et en cônes. L'activité ATPase AAA+ de Vps4 est indispensable au processus de remodelage, voire de fission, médié par ESCRT-III.

Le processus de remodelage se terminant par une fission membranaire, appelé « dôme », implique d'abord le complexe ESCRT-0 pour initier la formation du filament. Le complexe ESCRT-III se forme ensuite par addition successive de protéines CHMPs. Le filament s'accroît

et forme une spirale avec des anneaux de plus en plus étroits. Consécutivement à la formation de cette spirale, la membrane forme un « cou » jusqu'à sa fission complète (ce dôme peut pointer vers le cytoplasme ou vers l'extérieur) (**Figure 82**).

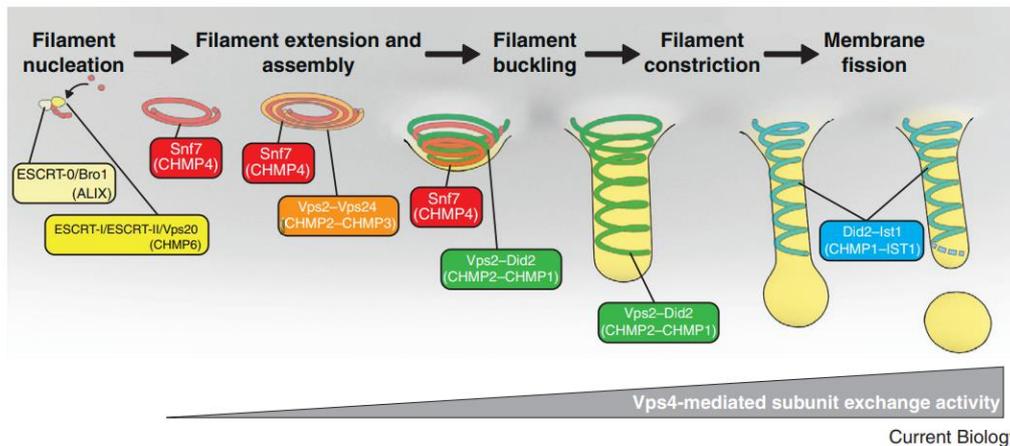


Figure 82 | Modèle classique en dôme formé par le complexe ESCRT-III permettant la constriction et la fission membranaire.

La figure illustre comment l'assemblage et la substitution séquentielle de différents filaments ESCRT-III favorisent la formation de vésicules endosomales chez la levure *S. cerevisiae*. L'ajout des sous-unités du filament est médié par l'activité de Vps4. Les homologues protéiques CHMPs chez l'Homme sont entre parenthèses (McCullough & Sundquist, 2020).

Le complexe ESCRT-III est aussi impliqué dans la réparation de la membrane, en particulier la membrane plasmique, l'enveloppe nucléaire et la membrane endosomale. Concernant la membrane plasmique, cette réparation se fait par bourgeonnement ou par endocytose et est induit par une cascade de signalisation médiée par l'entrée de Ca^{2+} via l'espace membranaire endommagé. Le complexe ESCRT-III est capable de réparer des espaces membranaires d'une taille inférieure à 10 nm et endommagés par exemple par des forces mécaniques, des détergents ou des toxines formants des pores. Le recrutement de ESCRT-III à la membrane conduit à un bourgeonnement jusqu'à la fission membranaire selon le même mécanisme décrit pour le remodelage (voir ci-dessus et **Figure 82**).

Concernant PspA et Vipp1, par la méthode du modèle de Markov caché, elles ont d'abord été identifiées comme des homologues de ESCRT-III (J. Liu et al., 2021). De plus, elles partagent une similarité de structures secondaires, ces dernières étant exclusivement hélicoïdales (**Figure 83a**). De plus, l'organisation des hélices et en particulier, le superenroulement des hélices est conservé entre toutes ces protéines (**Figure 83b**) (Junglas et al., 2021; J. Liu et al., 2021). PspA, observée par cryo-microscopie électronique, forme des structures en tige, assimilables à des filaments, d'une largeur d'environ 20 nm et de longueurs variables formant un motif en forme de « sapin de Noël » (**Figure 83c**) (Junglas et al., 2021). Des structures en forme d'anneau ou de piles d'anneaux (appelés « stacks ») mais aussi en forme de filament,

déjà observées auparavant, ont été une nouvelle fois mises en évidence chez Vipp1 (J. Liu et al., 2021).

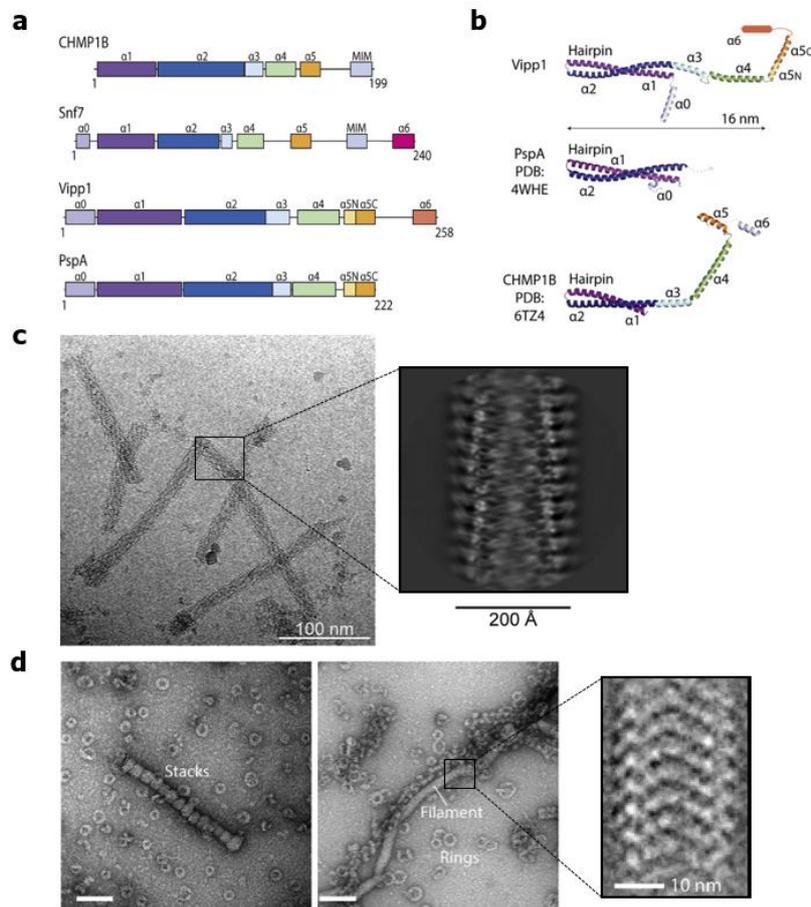


Figure 83 | Les protéines PspA et Vipp1 sont homologues à ESCRT-III.

Les structures secondaires des protéines CHMP1B (ESCRT-III humaine), Snf (ESCRT-III de *S. cerevisiae*), de Vipp1 et de PspA. L'hélice 5 de PspA et Vipp1 est bicolore car son homologie avec ESCRT-III n'est pas confirmée (a). Le surenroulement des hélices est une caractéristique commune à PspA, Vipp1 et CHMP1 (sous-unité B) (b). Structure de PspA en forme de filament, de 20 nm de diamètre zoomée pour observer la forme en « sapin de Noël » (c). Structures de Vipp1 en stacks, en filament ou en anneau (échelle : 100 nm). La structure du filament, de 24 nm diamètre, est zoomée pour observer la forme en « sapin de Noël » (d). La figure a été construite à partir des articles de Junglas et Liu (Junglas et al., 2021; J. Liu et al., 2021).

Compte tenu de cette homologie de structure avec ESCRT-III, PspA et Vipp1 ont été testées quant à leur capacité à remodeler la membrane. Lorsque PspA, en forme de tige, est mise en contact avec un extrait lipidique polaire d'*E. coli* (EPL), la dimension et le périmètre des vésicules augmentent ($\geq 2 \mu\text{m}$) suggérant que PspA se fixe sur les lipides pour convertir des petites vésicules en larges structures membranaires par fusion (Junglas et al., 2021).

De plus, la bicouche lipidique est visible dans la lumière du filament formé par PspA et plus précisément côté positif de ce dernier (en sachant qu'une incurvation membranaire vers le cytoplasme est dite négative). L'insertion de la bicouche lipidique se fait grâce à l'agrandissement du diamètre du filament qui passe de 220 Å à 275 Å (Figure 84a). Ainsi, les

filaments de PspA peuvent incorporer une bicouche lipidique dans la lumière centrale, produisant des tubules membranaires resserrés et incurvés.

Dans le cas de cette étude l'incurvation médiée par PspA est positive, comme Vipp1. Autour de ces vésicules et de ces filaments se trouve aussi une zone de forte densité lipidique de texture granuleuse contenant des molécules de PspA dissociées du filament. Les auteurs supposent que ce réseau lipidique dense sert de zones de transfert lipidique (LTZ pour lipid transfer zones) permettant le mouvement des lipides entre deux vésicules (**Figure 84a**). Des observations similaires ont été mises en évidence chez Vipp1 (J. Liu et al., 2021).

Au contact de liposomes d'*E. coli*, des interactions avec la structure en anneau ou stacks ont été mises en évidence. Ces structures se trouvent directement en contact avec la surface membranaire soit au-dessus, sur les côtés ou même formant un pont entre deux liposomes (**Figure 84b**). Comme pour PspA, Vipp1 adsorbe la bicouche lipidique au sein de la lumière de l'anneau ou de stacks, ce qui forme un « cou » et une incurvation positive de la membrane (**Figure 84b**).

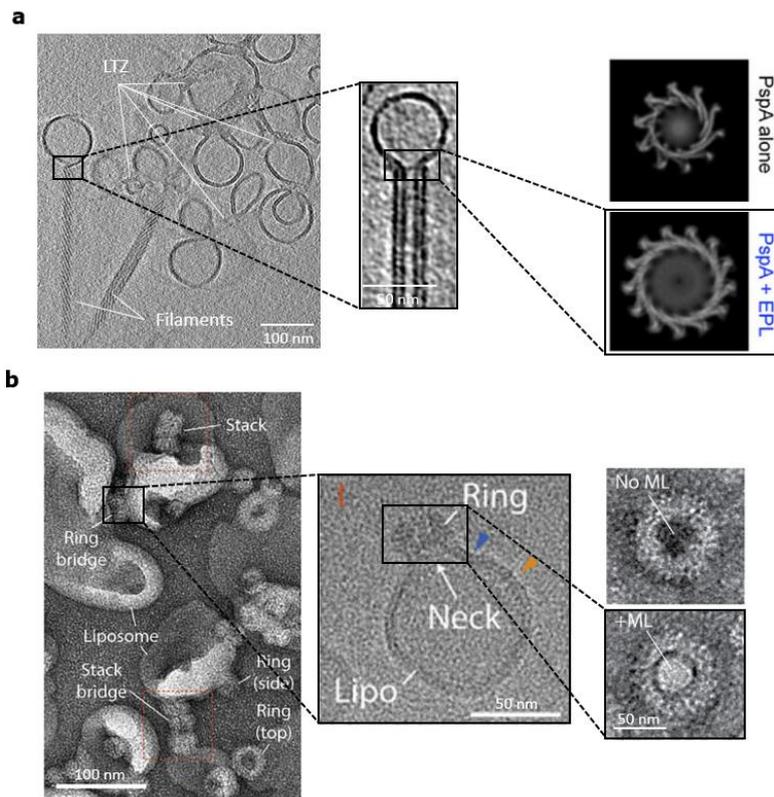


Figure 84 | Les protéines PspA et Vipp1 sont capables de remodeler les membranes.

Les structures en filament formées par PspA interagissent avec les vésicules (gauche) et incorporent dans leur lumière la bicouche lipidique de la vésicule (centre). L'insertion de la bicouche lipidique se fait grâce à l'agrandissement du diamètre du filament (droite, EPL : *E. coli* polar lipids) (**a**). Le surenroulement des hélices est une caractéristique commune à PspA, Vipp1 et CHMP1 (sous-unité B) (**b**). La figure a été construite à partir des articles de Junglas et Liu (Junglas et al., 2021; J. Liu et al., 2021).

Ces deux études indépendantes, confirment bien que les protéines PspA et Vipp1 possèdent des capacités de remodelage de la membrane en *in vitro*. Un mécanisme basé sur les observations cryo-microscopiques a été proposé pour chacune des protéines.

PspA serait capable de fusion, fission et constriction. Elle serait d'abord sous forme de filaments ou de plateformes ancrés à la membrane de la vésicule. Le côté chargé du filament continuerait sa polymérisation jusqu'à rencontrer une partie membranaire chargée négativement d'une seconde vésicule. Une fois le contact établi entre les deux vésicules, le filament se désassemble à partir de son côté chargé et PspA initie la formation de LTZ (**Figure 85a 1. et 2.** à gauche). Si les deux vésicules connectées sont proches, ces LTZ permettraient le déplacement des lipides entre la membrane de la vésicule donneuse et la membrane de la vésicule receveuse jusqu'à fusion des deux membranes (**Figure 85a 2a. et 3a.** à droite). Dans le cas où, les deux vésicules connectées sont éloignées, la membrane de la première vésicule s'insérerait dans la lumière de la seconde vésicule (**Figure 85a 2b. et 3b.** à droite), formant un système à deux membranes. Enfin, les deux vésicules pourraient l'une et l'autre partager leur membrane, ainsi après phénomène de fission, chaque vésicule se compose de deux membranes (**Figure 85a 2c. et 3c.** à droite).

Concernant Vipp1, le phénomène de bourgeonnement/réparation membranaire par fusion impliquerait la structure en anneaux tandis que le stack interviendrait dans le phénomène de tubulation. La structure en anneaux est en réalité constituée de 6 étages. En partant de la base de l'anneau et en remontant jusqu'au sommet, le diamètre de chacun de ces 6 étages rétrécit. Ainsi, la membrane endommagée est adsorbée au sein de la lumière de l'anneau et se voit de plus en plus comprimée à mesure qu'elle monte dans l'anneau jusqu'à ce que les feuillettes convergent et fusionnent au sommet (**Figure 85b** à gauche). Le phénomène de tubulation impliquerait le même mécanisme d'adsorption et de constriction mais cette fois-ci avec des structures beaucoup plus longues comme les stacks et les filaments (**Figure 85b** à droite). Ceci pourrait par exemple avoir lieu au sein du pont formé par le stack qui relie les deux liposomes afin de les fusionner.

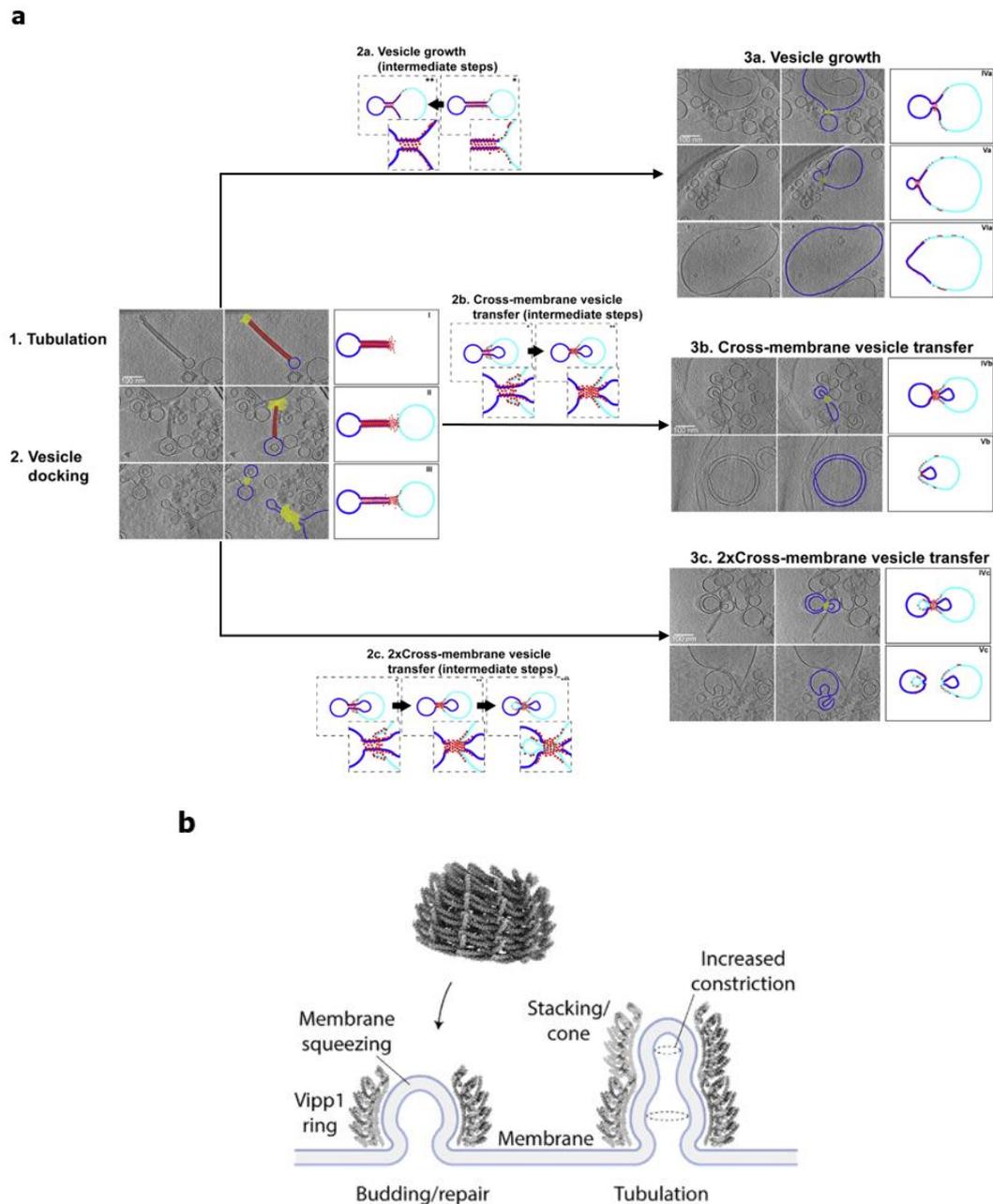


Figure 85 | Hypothèses du mécanisme de remodelage effectué par PspA et Vipp1.

Événements successifs permettant la fusion ou la fission membranaire médiés par PspA. En rouge : PspA (filament et plus petite unité), en jaune : LTZ, en bleu foncé : membrane donneuse et en bleu ciel : membrane receveuse **(a)**. Schéma représentant le mécanisme d'action de Vipp1 dans la réparation et le remodelage de la membrane **(b)**. La figure a été construite à partir des articles de Junglas et Liu (Junglas et al., 2021; J. Liu et al., 2021).

L'étude de Gupta et collaborateurs, confirme aussi l'homologie avec ESCRT-III mais apporte des précisions quant au mécanisme médié par Vipp1 (Gupta et al., 2021). Alors que le complexe ESCRT-III se polymérise et se dépolymérise à l'aide de l'ATPase AAA+ Vps4, Vipp1, seule, est capable d'hydrolyser l'ATP et l'ADP durant sa polymérisation en anneau. Dans le modèle de Liu et collaborateur, Vipp1 arriverait au contact de la membrane sous forme d'anneau. D'après Gupta et collaborateurs, la formation de cet anneau commence par l'étagage

1, soit le sommet, puis l'addition de l'étage 2 qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP ou de l'ADP. Enfin, l'addition des étages 3 à 6 ne nécessite plus l'hydrolyse d'ATP ou d'ADP. Ce modèle de polymérisation est la nucléation qui implique l'oligomérisation de l'anneau du sommet vers la base (**Figure 86** en haut). La formation de l'anneau peut aussi commencer par l'étage 6, soit la base, et l'addition successive de chaque étage nécessite l'hydrolyse d'ATP ou d'ADP (**Figure 86** au centre). Enfin, l'anneau peut se construire directement à la membrane en commençant par l'étage 6, soit la base puis par ajout successif des étages suivants, grâce à l'hydrolyse d'ATP ou d'ADP. Au fur et à mesure que les étages s'ajoutent, la membrane est adsorbée dans la lumière (**Figure 86** en bas). Ces deux derniers modèles impliquent une oligomérisation du bas vers le haut.

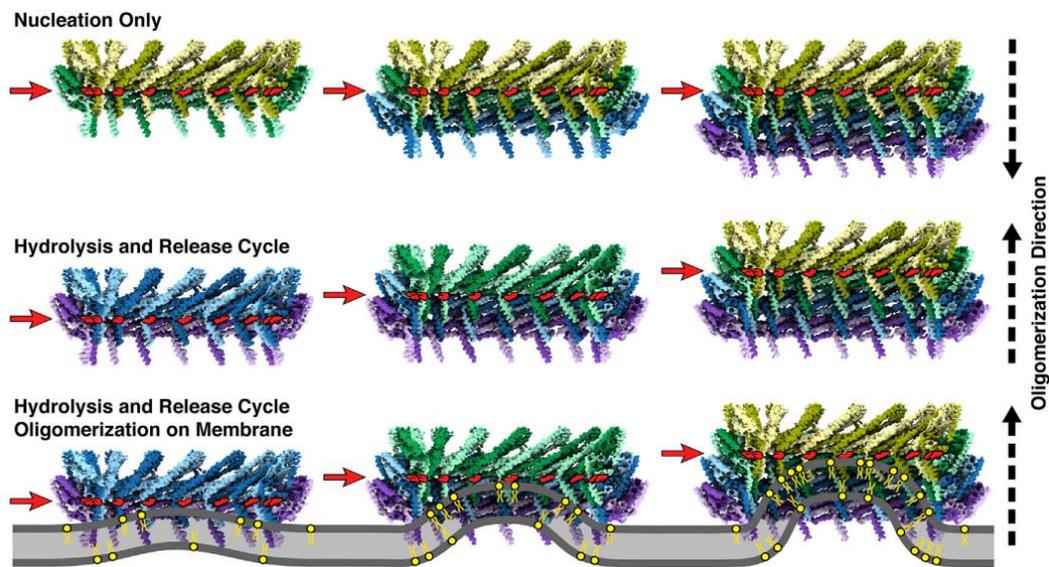


Figure 86 | Vipp1 s'oligomérisé à la membrane ou en dehors grâce à son activité ATPase.

Dans le modèle de nucléation (en haut), l'anneau s'oligomérisé grâce à l'hydrolyse de l'ATP ou de l'ADP entre l'étage 1 et l'étage 2. La position du nucléotide est indiquée en rouge. L'oligomérisation continue avec les étages 3 à 6 sans hydrolyse. Au centre, la structure en anneau est construite à partir de la base et nécessite une hydrolyse de l'ATP ou de l'ADP à chaque étage. Dans le dernier modèle, la structure en anneau se construit à la membrane en se fixant sur les lipides anioniques (en jaune) selon le même principe que précédemment (Gupta et al., 2021).

L'ensemble de ces travaux ont mis en lumière le mécanisme d'action de PspA et Vipp1 à la suite d'une induction du système. Les protéines PspA, Vipp1 et ESCRT-III forment donc une famille qui possèdent des capacités de remodelage ancestrales grâce à la conservation de leur structure et de leur propriété d'oligomérisation. L'oligomérisation de Vipp1 et de ESCRT-III sont dépendantes de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP tandis que, pour le moment aucune ATPase n'a été mise en évidence dans le cas de PspA.

En considérant l'homologie de structure de BacB avec PspA et Vipp1, la question centrale concerne la conservation des propriétés de remodelage par BacB. En d'autres termes, est-il raisonnable de transposer les mécanismes d'actions de Vipp1 et PspA à BacB ?

À ce jour, nos travaux ne permettent pas de répondre à cette question mais des hypothèses peuvent être émises. En effet, l'observation du dimère de BacB par western Blot met en évidence des probables propriétés d'oligomérisation. De plus, d'après les travaux bio-informatiques, BacE serait une ATPase AAA+ de type I comme Vps4 impliquée dans la polymérisation et la dépolymérisation de ESCRT-III. En outre, les éléments structuraux qui composent BacE la classe dans les clades qui seraient impliquées, entre autres, dans l'assemblage/désassemblage de complexes protéiques. Ainsi, à l'image de ESCRT-III et Vps4, BacF grâce à son activité ATPase pourrait fournir l'énergie nécessaire pour l'oligomérisation et de BacB.

Concernant BacB, des travaux supplémentaires devront être menés pour *i)* trouver les conditions inductrices du système, *ii)* confirmer que BacB s'oligomériser en une ou plusieurs structures comme PspA et Vipp1, *iii)* démontrer une interaction entre BacB et BacF, *iv)* mettre en évidence une interaction entre des lipides anioniques et BacB et observer de possible remodelages membranaires.

Chapitre 2 : La protéine BacD et premières investigations des lipid rafts de *P. aeruginosa*

I. Les lipid rafts et les microdomaines fonctionnels membranaires

Les cellules eucaryotes possèdent un haut niveau de compartimentalisation. Chaque organelle, délimitée par une membrane, participe à un processus biologique précis : la génération de l'énergie dans la mitochondrie, l'assemblage de protéines dans le réticulum endoplasmique, la réplication et la transcription dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme. Concernant la membrane plasmique, elle était au départ considérée comme une organelle universelle peu compartimentalisée. Elle est en réalité très structurée et notamment composée de lipides présentant différentes propriétés physicochimiques. Les différentes espèces de lipides se répartissent au sein de la membrane et ceux qui contiennent des propriétés similaires se regroupent pour former des « radeaux lipidiques » ou « lipid rafts ». Ces lipid rafts sont cruciaux car ils servent de supports aux protéines membranaires dont la fonction dépend d'un environnement lipidique spécifique. Ainsi, les lipid rafts avec leur protéines associées forment un microdomaine fonctionnel. La membrane est donc parsemée d'une multitude de microdomaines fonctionnels. Par exemple, les lipid rafts enrichis en cholestérol et sphingolipides permettent la localisation de protéines impliquées dans la transduction du signal ou dans le transport. En plus d'arbore des lipides particuliers, les lipid rafts contiennent des flotillines. Ces protéines ont été abordées lors de l'étude bio-informatique de BacD, supposée être une p-flotilline. Les flotillines ancrées dans les lipid rafts sont indispensables et s'apparentent à des chaperonnes car elles participent au recrutement des protéines qui ont besoin d'être localisées dans ces lipid rafts soit pour leur fonction, leur interaction avec d'autres partenaires ou pour leur oligomérisation. Les flotillines en tant que protéine « échafaudage » jouent donc un rôle crucial dans l'organisation et l'architecture des lipid rafts.

Pendant une longue période, ces lipid rafts ont été considérés comme exclusifs aux eucaryotes. En effet, les membranes bactériennes étant dépourvues de cholestérol (sauf quelques exceptions) et les cellules très peu compartimentalisées, la présence de microdomaines fonctionnels semblait peu probable. Le modèle de la structure membranaire le plus largement accepté est le modèle en « mosaïque fluide » de Singer et Nicholson qui propose que les membranes soient des bicouches lipidiques dans lesquelles flottent des protéines.

Ce modèle est aujourd'hui remis en question. En effet, la membrane des bactéries est structurée grâce à une grande variété de lipides et de protéines. Les bactéries compartimentalisent elles aussi, les processus cellulaires au sein de leur membrane formant ainsi des microdomaines fonctionnels. Ces domaines se composent, entre autres, des systèmes à deux composants, des systèmes de sécrétion et des systèmes de régulation de l'homéostasie membranaire impliquant par exemple les protéases à activité ATPase.

Avec la découverte des p-flotillines chez les procaryotes, les lipid rafts ne sont plus exclusifs aux eucaryotes. Les p-flotillines ont des fonctions similaires à celles des eucaryotes. Elles agissent comme des chaperonnes impliquées dans le recrutement des protéines qui nécessitent d'être localisées dans un environnement lipidique particulier et elles sont des protéines « échafaudage » car elles participent au maintien de l'architecture du lipid rafts.

L'hypothèse de l'existence d'un microdomaine fonctionnel mettant en lien la composition lipidique et la fonction protéique a été émise lors de recherches qui, initialement concernaient la formation de biofilm chez *B. subtilis*. La protéine senseur KinC, impliquée dans la formation de biofilm, perd sa fonction et sa localisation membranaire chez une souche délétée du gène *yisP* incapable de produire du farnésyle et des lipides polyisoprénoïdes et de former des biofilms (López & Kolter, 2010).

L'analyse de ces microdomaines fonctionnels supposés a donc débuté. L'approche expérimentale employée fût la même que pour les eucaryotes. Les lipid rafts, grâce à leur composition lipidique particulière sont plus compacts et hydrophobes ce qui les rend plus résistants à l'action des détergents ioniques. Il forme des régions appelées « liquid order » (Lo) où les lipides sont agencés de façon compacte. Par opposition, les régions plus fluides où les lipides sont désordonnés sont appelées « liquid disorder » (Ld).

La procédure consiste donc à séparer deux fractions : *i*) la fraction sensible au détergent (DSM pour detergent sensitive membrane) et *ii*) la fraction résistante au détergent (DRM pour detergent resistant membrane) soit par un gradient de sucrose soit par action de détergent. C'est d'ailleurs à cause de la technique par gradient de sucrose que ces protéines ont été appelées flotillines car elles semblaient « flotter » au-dessus du gradient.

Il est important de noter que cette procédure doit être vue comme un enrichissement, la fraction DRM ne doit pas être assimilée exclusivement aux lipid rafts mais comme une fraction membranaire enrichie en lipid rafts (Brown, 2002).

À l'image des eucaryotes, l'analyse par spectrométrie de masse des DRM de *B. subtilis* révéla un nombre important de protéines impliquées dans le transport, la signalisation et la sécrétion. La protéine KinC a été retrouvée exclusivement dans les DRM mais ces derniers étaient surtout enrichis de protéines de fonction inconnue mais homologues aux flotillines eucaryotes, connues aujourd'hui sous le nom de FloA et FloT (ou YuaG).

Par microscopie à fluorescence, FloT présente une localisation hétérogène dans des régions précises de la membrane, appelées « foci », renforçant l'existence de microdomaines fonctionnels. De plus, les DRM enrichis par FloA et FloT sont principalement constitués de cardiolipines (Donovan & Bramkamp, s. d.). Pour finir, la protéine KinC se colocalise avec FloA et FloT et chez une souche déficiente pour le gène *yisP*, cette colocalisation n'est pas retrouvée, suggérant que le farnésyle et les lipides polyisoprénoïdes produits par YisP sont indispensables pour la signalisation correcte de KinC (Bergstrom et al., 1993; Donovan & Bramkamp, s. d.).

Bien que *B. subtilis* soit encore le modèle pour l'étude des lipid rafts, l'analyse de ces derniers s'est étendue à d'autres bactéries dont *E. coli*, *A. tumefaciens*, *S. aureus* et *B. burgdorferi*, *H. pylori* révélant un « core protéome » commun à tous les DRM (Czolkoss et al., 2021; Guzmán-Flores et al., 2019; Hutton et al., 2017; G. Koch et al., 2017; Mielich-Süss et al., 2017; Toledo et al., 2015).

II. Contexte et objectif de l'étude

D'après l'étude bio-informatique, BacD serait une protéine SPFH et plus particulièrement une p-flotilline. Outre les analyses protéomiques menés sur les DRM, les différentes études menées sur les p-flotillines telles que FloA, FloT ou YqiK ont démontré leur implication dans différents processus cellulaires comme la division, la formation de biofilm, la mobilité, la résistance au stress oxydatif, la fluidité membranaire ou encore la morphologie cellulaire (Czolkoss et al., 2021; Dempwolff et al., 2012; Padilla-Vaca et al., 2019; Wessel et al., 2023; Z. Yang et al., 2021).

Une étude phénotypique a donc débuté sur une souche déficiente pour le gène *PA14_16180* (nommée par la suite $\Delta bacD$) et provenant de la collection de mutants disponible au PBS (Liberati et al., 2006). Cette étude phénotypique n'étant qu'à ses débuts, ce sont les premiers résultats qui sont présentés ici. Avant cette étude, la bonne insertion du transposon dans le gène *PA14_16180* et son impact sur la croissance ont été vérifiés.

La présence de BacD en tant que flotilline suggère aussi que *P. aeruginosa* pourrait contenir au sein de sa membrane des microdomaines fonctionnels organisés dans les lipid rafts.

Il n'existe à ce jour aucune étude concernant les lipid rafts de *P. aeruginosa* que ce soit au niveau de leur composition lipidique ou protéique. Ainsi, nous avons mené une étude protéomique sur la fraction DRM afin d'étudier le protéome enrichi dans les lipid rafts. En se basant sur les études précédentes nous avons fait le choix d'extraire les DRM grâce au kit CellLytic™ MEM Protein, initialement conçu pour l'extraction des DRM eucaryotes mais qui a aussi donné des résultats chez les bactéries (Czolkoss et al., 2021; Guzmán-Flores et al., 2019; Hutton et al., 2017; G. Koch et al., 2017; Mielich-Süss et al., 2017; Toledo et al., 2015).

Cette étude reste une étude préliminaire et est présentée de façon à apporter une première vue d'ensemble concernant les processus cellulaires associés aux lipid rafts. Le protéome obtenu est donc toujours comparé aux protéomes connus pour être enrichis dans les DRM.

Pour obtenir le protéome enrichi dans les DRM, nous avons fait le choix de mener une étude quantitative par approche label-free entre la fraction DRM et DSM (**Figure 87**). Les peptides ont été analysés par nLC-MS/MS grâce au spectromètre de masse Q-Exactive Plus. La quantification et l'identification des protéines ont été effectuées grâce au logiciel Progenesis. Les spectres MS/MS ont été utilisés pour l'identification tandis que les cartes peptidiques (temps de rétention en fonction du rapport m/z) ont été utilisées pour la quantification.

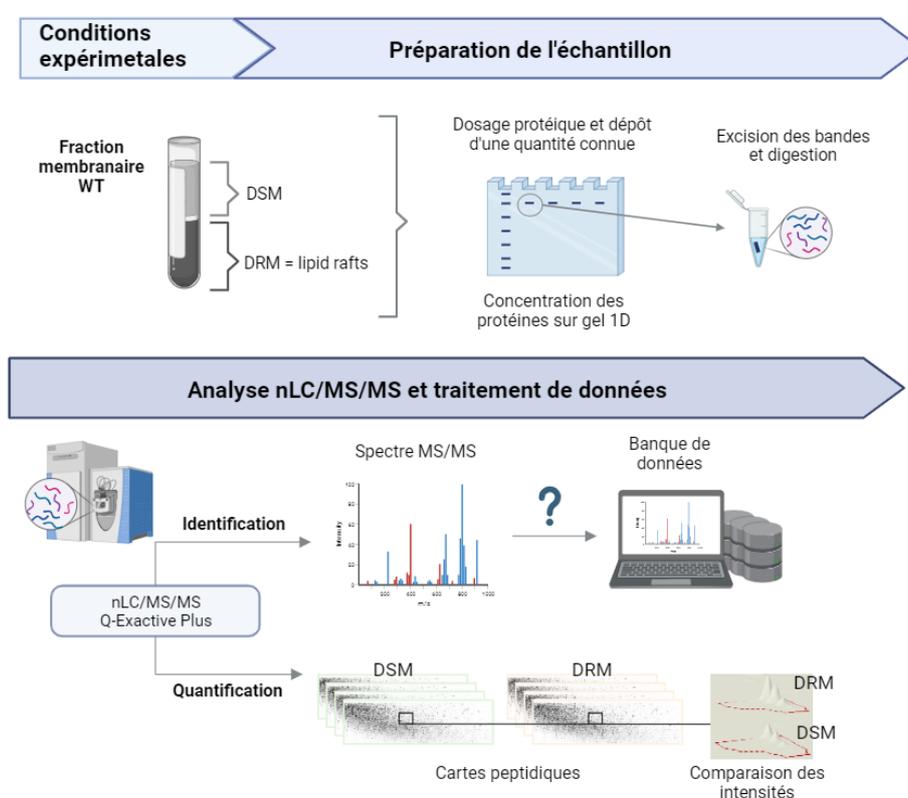


Figure 87 | Stratégie employée pour l'étude quantitative des lipid rafts de la souche WT selon l'approche label-free.

III. Résultats et discussion

III.1 Études phénotypiques

Avant de réaliser les différents tests phénotypiques, l'insertion du transposon dans le gène *PA14_16180* a été confirmée (**Figure 88a**).

La seconde vérification concerne la croissance d mutant $\Delta bacD$. D'après la **Figure 88b**, le transposon n'affecte pas la croissance du mutant.

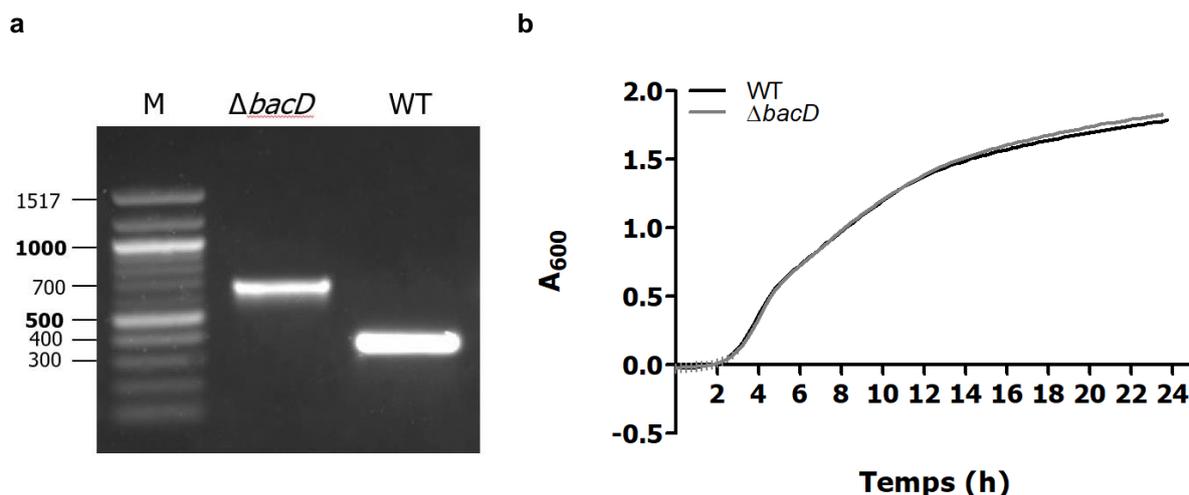


Figure 88 | Études préliminaires réalisées sur la souche $\Delta bacD$.

Vérification de l'insertion du transposon par PCR. M : marqueur de poids moléculaires, piste 1 : gène *PA14_16180* contenant le transposon, piste 2 : gène *PA14_16180* sauvage (a). Croissance de la souche WT et $\Delta bacD$ en milieu LB à 37°C pendant 48 h (b).

Chez *B. subtilis*, la double mutation ou la mutation respective de *floA* et *floT* induit une diminution de la mobilité (Dempwolff et al., 2012). À l'inverse, chez *E. coli*, la délétion de *yqjK* provoque une augmentation de la mobilité swimming (Padilla-Vaca et al., 2019). Concernant $\Delta bacD$, l'insertion du transposon dans le gène *PA14_16180* a un impact modéré sur la mobilité de type swimming (Figure 89a) et aucun impact sur les autres mobilités (données non présentées).

L'absence de BacD conduit également à une perte significative de la fluidité membranaire (Figure 89b), observée aussi chez *B. subtilis* suite à la délétion de *yqjI*, *floA* et *floT* (Bach & Bramkamp, 2013; Z. Yang et al., 2021; Zielińska et al., 2020).

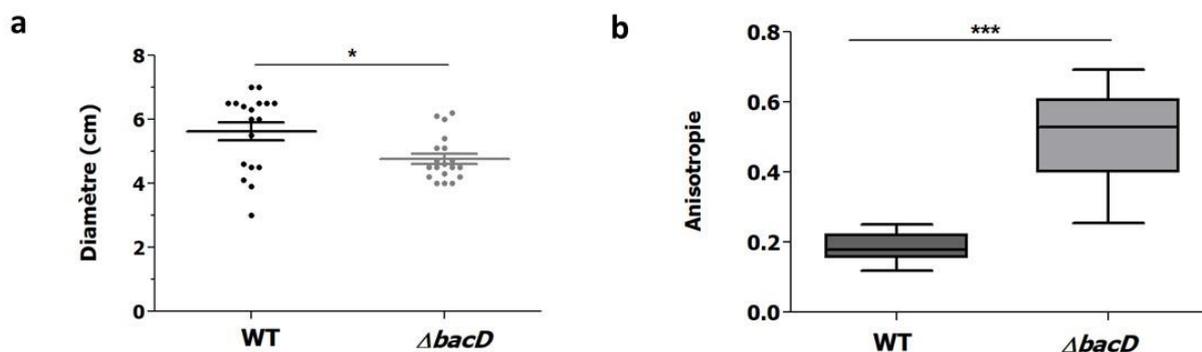


Figure 89 | Étude phénotypique menée sur la souche $\Delta bacD$.

Distance parcourue par les souches WT et $\Delta bacD$ en mobilité swimming sur une gélose agar après 16 h d'incubation à 37°C, * : t test $p < 0,05$ (a). Fluidité membranaire des souches WT et $\Delta bacD$ obtenue par mesure d'anisotropie, *** : t test $p < 0,0001$ (b).

La mutation d'un gène codant pour une flotilline engendre systématiquement une diminution de la fluidité membranaire et une déformation de la morphologie de la cellule. L'état de la surface membranaire et la morphologie de $\Delta bacD$ étant encore incertains, nous avons confirmé l'un de ces deux phénotypes chez la souche $\Delta bacD$. Les mécanismes sous-jacents à ces phénotypes ont été éclaircis grâce à une étude menée par Zielinska et collaborateurs chez *B. subtilis* (Zielińska et al., 2020). La morphologie de la bactérie est principalement due à la structure de son peptidoglycane. La synthèse de ce dernier est possible grâce à l'élongasome et le divisome qui agissent respectivement sur la partie cellulaire longitudinale et celle prête à se diviser. La coordination de ces complexes respectifs est médiée par MreB et FtsZ. Le déplacement de MreB de long de l'axe longitudinal conduit à l'élongation de la cellule. Chez *B. subtilis*, certaines protéines en lien avec la synthèse du peptidoglycane ont été identifiées dans les DRM (Bach & Bramkamp, 2013; López & Kolter, 2010).

Lorsque les cellules sont cultivées en milieu riche, la fréquence de division cellulaire est élevée. Chez une souche déficiente pour les gènes codants les flotillines et en phase exponentielle de croissance, la synthèse de peptidoglycane est délocalisée au niveau des pôles de la cellule, là où se produit la division et les cellules sont plus allongées. Cette délocalisation et le phénotype allongé ne sont pas retrouvés lorsque le mutant est cultivé en milieu minimum, là où la fréquence de division est plus faible. Cette observation suggère que ces phénotypes associés à l'absence de flotillines sont dépendants du taux de croissance et/ou de l'accessibilité aux nutriments.

Le marquage fluorescent par le Laurdan, spécifiquement utilisé par analyser les régions lipidiques compacts (Lo) formées par les flotillines, montre que la culture en milieu riche augmente la rigidité des membranes des mutants, sans modification de la composition lipidique, tandis qu'en milieu minimum ce phénotype disparaît.

Chez *B. subtilis*, le taux de croissance et la synthèse du peptidoglycane sont liés à la vitesse de déplacement de MreB. Cette dernière est ralentie en milieu minimum tandis qu'elle augmente en milieu riche. D'après l'observation par microscopie en temps réel, en l'absence de flotilline, la vitesse de déplacement de MreB est diminuée en milieu LB mais reste inchangée en milieu minimum. Lorsque cette fluidité est restaurée chez le mutant à l'aide d'alcool benzylique, la vitesse de déplacement de MreB revient à la normale en milieu LB. Ceci démontre que la fluidité membranaire a un impact direct sur la vitesse de déplacement de MreB et par extension sur la synthèse du peptidoglycane et le taux de croissance.

Enfin, l'ajout de FloT pure au contact de liposomes augmente fortement la fluidité membranaire indiquant que la régulation de la fluidité membranaire se fait par interaction directe entre les flotillines et les lipides.

Cette étude démontre que, les flotillines régulent finement la fluidité membranaire dans le but d'augmenter ou de diminuer la vitesse de déplacement de MreB et ainsi adapter le taux de croissance en fonction des conditions de croissance. Lorsque le taux de croissance est élevé les flotillines conserveraient une certaine fluidité membranaire critique pour le bon fonctionnement de la synthèse du peptidoglycane et inversement. Cette hypothèse corrèle avec de précédents résultats qui démontrent que les flotillines sont capables de recruter des lipides plus rigides comme des hépanoïdes ou des caroténoïdes (Bramkamp & Lopez, 2015; García-Fernández et al., 2017; López & Kolter, 2010).

Cette étude pourrait donc être le point de départ pour de futures investigations concernant notre souche $\Delta bacD$.

III.2 Analyse protéomique des lipid rafts de *P. aeruginosa*

Cette étude protéomique a été menée dans le but de présenter dans son ensemble les protéines enrichies dans la fraction DRM.

Sur un total de 1875 protéines identifiées, 978 protéines ont présenté des différences d'abondances significatives entre les fractions DRM et DSM. Parmi elles, 448 protéines sont enrichies dans les DRM (**Figure 90a**).

Pour vérifier la qualité de nos échantillons, les protéines ont été classées selon leur localisation. Concernant les 978 protéines significativement dérégulées, bien que, durant la préparation de l'échantillon, la fraction membranaire a été isolée, 41% des protéines (397 protéines) sont localisées dans le cytoplasme. La fraction membranaire représente tout de même 32% au total (27% pour la membrane interne et 5% pour la membrane externe) ce qui correspond à 317 protéines. On note la présence d'environ 3% de protéines qui possèdent plusieurs localisations, ces protéines peuvent être des protéines moonlighting connues pour posséder différentes fonctions et localisations (**Figure 90b** diagramme de gauche).

En considérant cette fois-ci uniquement les protéines enrichies dans la fraction DRM plus de la moitié (58%) sont associées à la membrane ce qui représente 257 protéines. Il réside tout de même une fraction cytoplasmique qui représente 13% soit 56 protéines. Enfin environ une centaine de protéines ont une localisation inconnue (98 protéines) (**Figure 90b** diagramme de droite).

Les protéines enrichies dans les DRM ont ensuite été classées selon leur fonction (**Figure 90c**). La fonction majoritaire (18%) est le transport de petites molécules attribués à 83 protéines suivies de 43 protéines impliquées respectivement dans le métabolisme des lipides et énergétique. On note aussi la présence non négligeable de protéines impliquées dans une activité enzymatique (25 protéines), dans la sécrétion (24 protéines), dans le chimiotactisme (19 protéines) et dans la mobilité/attachement (16 protéines).

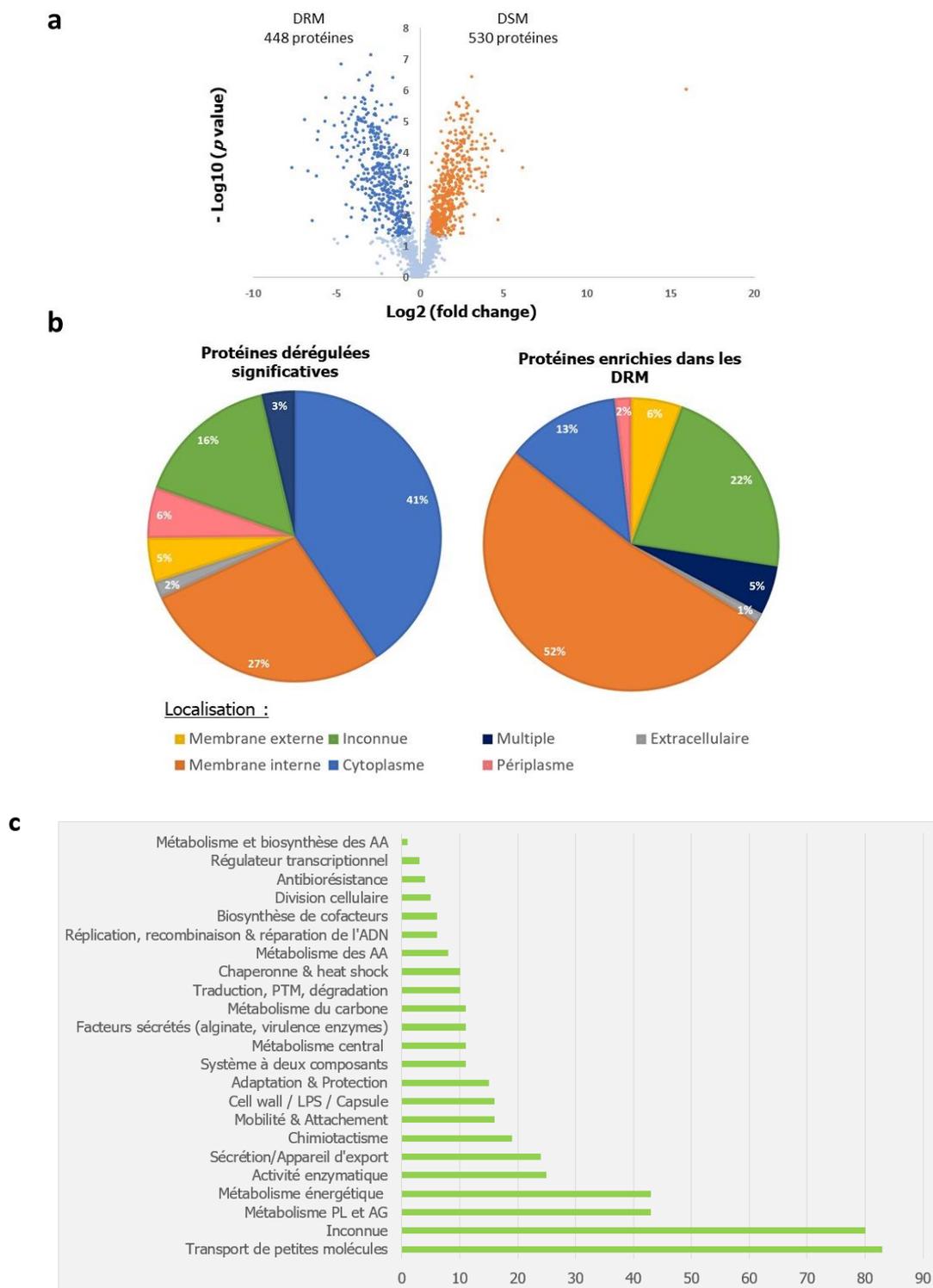


Figure 90 | Analyses protéomiques des DRM.

Les protéines significativement dérégulées sont représentées sur un volcano plot. Les protéines sont représentées par des cercles et placées selon leur valeur de p-value et de fold change. Les protéines représentées par des points bleu clair ne possèdent pas d'abondance différentielle significative (a). Classification des 978 protéines significativement dérégulées et des 448 protéines enrichies dans les DRM selon leur localisation (b). Classification des protéines enrichies dans les DRM selon leur fonction (PseudoCAP), AA : acides aminés, PTM : modifications post-traductionnelles, PL et AG : phospholipides et acide gras (c).

Un certain nombre de protéines intervenant dans ces fonctions sont détaillées dans les tableaux suivants (**Tableau 3, Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6, Tableau 7**).

Pour commencer nous avons recherché, les protéines SPFH et leur partenaire d'interaction, comme les protéines FtsH ou NfeD, car elles sont communément co-purifiées avec la fraction DRM. *P. aeruginosa* posséderait 4 protéines SPFH, elles ont d'ailleurs été évoquées lors de l'étude bio-informatique de BacD : *i*) la p-stomatine PA14_05890 (PA0452 chez PAO1) et sa partenaire NfeD PA14_05880 (PA0451 chez PAO1), *ii*) les protéines HflK/C et leur partenaire FtsH et *iii*) BacD (PA14_16180) avec sa partenaire NfeD BacC (PA14_16160).

Les protéines SPFH HflK/C, p-stomatine et BacD n'ont malheureusement pas été retrouvées dans la fraction DRM. La p-stomatine n'est pas identifiée tandis que les protéines SPFH HflK/C et BacD sont présentes dans la fraction DSM. BacD est identifiée avec 3 peptides et deux d'entre eux n'ont pas été utilisés pour la quantification car la valeur de la p value n'était pas significative. De plus, la flotilline YqjI de *B. subtilis* a été retrouvée uniquement dans les DSM (Z. Yang et al., 2021). Il est donc difficile de statuer quant à la localisation de BacD.

En revanche, la protéine FtsH, le partenaire d'interaction des protéines SPFH HflK/C est retrouvée dans la fraction DRM avec un fold change de 5,44 (**Tableau 7**). De même pour la protéine PA14_05880, la partenaire NfeD de la p-stomatine, qui est retrouvée dans la fraction DRM avec un fold change de 4,51 (**Tableau 5**, surlignée en vert). Enfin, BacC, la partenaire NfeD de BacD, a été identifiée mais ne fait pas partie des protéines significativement dérégulées.

Nous retrouvons aussi, une vingtaine de protéines qui ont déjà été identifiées dans les lipid rafts lors de précédentes études portant sur *E. coli*, *A. tumefaciens*, *B. subtilis*, *B. burgdorferi* et *S. aureus* (Czolkoss et al., 2021; Guzmán-Flores et al., 2019; Hutton et al., 2017; G. Koch et al., 2017; Mielich-Süss et al., 2017; Toledo et al., 2015). Ces protéines sont surlignées en bleu foncé dans chacun des tableaux.

D'après les précédentes études, les DRM sont enrichis en protéines impliquées dans les processus de sécrétion et de transport de molécule. Ceci est aussi le cas concernant *P. aeruginosa* (**Tableau 3, Tableau 4**).

On retrouve notamment la lipoprotéine TssJ1 du SST6, ce dernier ayant été récemment localisé dans les DRM de *A. tumefaciens* (Czolkoss et al., 2021). Chez *S. aureus* c'est le SSTVII qui a été identifié les DRM (Mielich-Süss et al., 2017).

Les protéines du système de sécrétion Sec, en particulier YajC, SegG, SeD et SecY résident dans les lipid rafts de toutes les bactéries étudiées à ce jour. Il en est de même, concernant *P. aeruginosa*, où les systèmes Sec et Tat sont aussi très largement enrichis dans la fraction DRM. Les protéines TatA, TatB et TaTC étant aussi retrouvées dans la fraction DRM de *A.*

tumefaciens (Czolkoss et al., 2021). Les systèmes de transport d'efflux RND tels que MexA, connu pour sa participation à la résistance aux antibiotiques, de transport d'ions et de minéraux ont aussi été identifiés en plus de nombreux ABC transporteurs et de lipoprotéines (annexe 7).

Annotation	Fold change	Gene	Description
PA14_00960	11,49	<i>tssJ1</i>	SST6 lipoprotein
PA14_09050	3,25	<i>secY</i>	Preprotein translocase subunit SecY
PA14_14610	2,02	<i>yajC</i>	Preprotein translocase subunit YajC
PA14_14630	4,2	<i>secD</i>	Preprotein translocase subunit SecD
PA14_14650	5,06	<i>secF</i>	Preprotein translocase subunit SecF
PA14_23980	11,38	<i>xcpP</i>	Secretion protein XcpP
PA14_24020	16,25	<i>xcpT</i>	General secretion pathway protein G
PA14_24060	3,83	<i>xcpW</i>	General secretion pathway protein J
PA14_24070	4,62	<i>xcpX</i>	General secretion pathway protein K
PA14_24080	3,2	<i>xcpX</i>	General secretion pathway protein L
PA14_24100	11,29	<i>xcpZ</i>	General secretion pathway protein M
PA14_42440	5,98	<i>popD</i>	Translocator outer membrane protein PopD precursor
PA14_42450	3,64	<i>popB</i>	Translocator protein PopB
PA14_48100	1,68	<i>aprE</i>	Alkaline protease secretion protein AprE
PA14_48115	2,08	<i>aprD</i>	Alkaline protease secretion protein AprD
PA14_62810	50,11	<i>secG</i>	Preprotein translocase subunit SecG
PA14_66960	7,34	<i>tatA</i>	Twin arginine translocase A
PA14_66970	3,91	<i>tatB</i>	Sec-independent translocase TatB
PA14_66980	11,38	<i>tatC</i>	Sec-independent translocase TatC
PA14_73410	10,17		Inner membrane protein translocase component YidC

Tableau 4 Transport			
Annotation	Fold change	Gene	Description
PA14_01960	8,74		RND efflux membrane fusion protein
PA14_03670	4,37	<i>cysW</i>	Sulfate transport protein CysW
PA14_05530	3,96	<i>mexA</i>	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA
PA14_12990	3,31		Choline transporter
PA14_13610	7,89		ABC transporter permease
PA14_13620	2,56	<i>nhaP</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
PA14_15780	2,49		PTS system N-acetylglucosamine specific IIBC component
PA14_40250	3,12		Efflux transmembrane transporter
PA14_51720	4,59	<i>tolB</i>	Translocation protein TolB
PA14_51730	4,3	<i>tolA</i>	TolA protein
PA14_52770	11,3	<i>aotM</i>	Arginine/ornithine transport protein AotM
PA14_52780	10,14	<i>aotQ</i>	Arginine/ornithine transport protein AotQ
PA14_53330	2,97	<i>aotQ</i>	Sulfate transport protein CysZ
PA14_54150	5,92	<i>putP</i>	Sodium/proline symporter PutP
PA14_56680	4,31	<i>feoB</i>	Ferrous iron transport protein B
PA14_58440	6,63	<i>dppB</i>	Dipeptide ABC transporter permease DppB
PA14_58450	3,69	<i>dppC</i>	Dipeptide ABC transporter permease DppC
PA14_68300	3,82	<i>arcD</i>	Arginine/ornithine antiporter
PA14_69130	6,81	<i>glpT</i>	Glycerol-3-phosphate transporter
PA14_69570	2,15	<i>corA</i>	Magnesium/cobalt transport protein

Chez les eucaryotes, les lipid rafts sont assimilés à de véritables « plateformes de signalisation » car ils hébergent des systèmes senseur et de transduction de signal afin de mieux orchestrer la réponse à des stimuli extérieurs. Ces plateformes sont aussi retrouvées dans les DRM de *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*, où ce sont respectivement les kinases senseur KinC, Walk et CusR qui ont été identifiées. Concernant *P. aeruginosa*, nous avons identifié CreB le régulateur de réponse du système à deux composants CreBC et les deux senseurs kinases PhoQ et CbrA des systèmes à deux composants PhoPQ et CbrAB. Ces systèmes régulent d'une façon générale la virulence, la réponse à l'exposition aux antibiotiques et la formation de biofilm. Enfin, MucA et AlgW font partie du système de régulation de la production de l'alginate tandis que RetS régule l'activité du système de régulation Gac/Rsm (Tableau 5).

Tableau 5 Réponse à un stimulus			
Annotation	Fold change	Gene	Description
PA14_05880	4,51		NfeD membrane-bound protease
PA14_06060	4,84	<i>creB</i>	DNA-binding response regulator CreB
PA14_13740	2,63	<i>narX</i>	Two-component sensor
PA14_16430	1,52	<i>wspA</i>	Chemotaxis transducer
PA14_17500	2,35	<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein MutS
PA14_27000	7,3		Chemotaxis transducer
PA14_33780	6,93		Transmembrane sensor
PA14_44300	1,76	<i>aeR</i>	Aerotaxis receptor Aer
PA14_49170	1,55	<i>phoQ</i>	Two-component sensor PhoQ
PA14_54420	9,33	<i>mucA</i>	Anti-sigma factor MucA
PA14_57760	4,51	<i>algW</i>	protease
PA14_62530	4,78	<i>cbrA</i>	Two-component sensor CbrA
PA14_64230	4,99	<i>retS</i>	Regulator of EPS and T3SS

Chez *E. coli* une partie de la chaîne respiratoire est située dans les lipid rafts et chez *P. aeruginosa*, un nombre élevé de protéine impliquées dans la chaîne respiratoire réside dans la fraction DRM (Guzmán-Flores et al., 2019). Le complexe I formé des protéines NADH déshydrogénases Nuo et le complexe IV formé par le cytochrome c sont deux composants de la chaîne de transport d'électron tandis que le complexe F0F1 formé par l'ATP synthase est impliqué dans l'étape finale de la respiration permettant d'obtenir l'ATP (Tableau 6).

Tableau 6 Métabolisme énergétique et des lipides			
Annotation	Fold change	Gene	Description
Métabolisme énergétique			
PA14_06720	3,35	<i>nirF</i>	
PA14_06810	6,28	<i>norC</i>	Nitric-oxide reductase subunit C
PA14_06830	3,03	<i>norB</i>	Nitric-oxide reductase subunit B
PA14_13030	6,8	<i>cioA</i>	Cyanide insensitive terminal oxidase
PA14_13830	2,6	<i>narI</i>	Respiratory nitrate reductase gamma chain
PA14_25305	1,89	<i>nqrB</i>	Na ⁽⁺⁾ translocating NADH-quinone reductase subunit B
PA14_25320	2,7	<i>nqrC</i>	Na ⁽⁺⁾ translocating NADH-quinone reductase subunit C
PA14_25330	3,59	<i>nqrD</i>	Na ⁽⁺⁾ translocating NADH-quinone reductase subunit D
PA14_29850	26,66	<i>nuoN</i>	NADH dehydrogenase subunit N
PA14_29860	8,02	<i>nuoM</i>	NADH dehydrogenase subunit M
PA14_29880	3,64	<i>nuoL</i>	NADH dehydrogenase subunit L
PA14_29930	9,11	<i>nuoH</i>	NADH dehydrogenase subunit H
PA14_30020	14,79	<i>nuoA</i>	NADH dehydrogenase subunit A
PA14_32600	24,99		Thiol:disulphide interchange protein
PA14_44020	1,57	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit
PA14_44050	14,69	<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase D subunit
PA14_44060	5,13	<i>sdhC</i>	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit
PA14_44340	5,07		Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I
PA14_44350	3,19		Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II
PA14_44360	5,18		Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit III
PA14_45280	5,13	<i>cycH</i>	Cytocgrome c-type biogenesis protein
PA14_45290	3,21	<i>ccmH</i>	Cytocgrome c-type biogenesis protein CcmH
PA14_45300	5,25	<i>ccmG</i>	Cytocgrome c-type biogenesis protein CcmG
PA14_45310	4,56	<i>ccmF</i>	Cytocgrome c-type biogenesis protein CcmF
PA14_45380	4,56	<i>ccmA</i>	Cytocgrome c-type biogenesis protein CcmA
PA14_64080	8,2	<i>dipZ</i>	Thiol:disulphide interchange protein
PA14_73290	5,8	<i>atpF</i>	F0F1 ATP synthase subunit B
PA14_73310	10,5	<i>atpB</i>	F0F1 ATP synthase subunit A
Métabolisme des lipides			
PA14_11470	17,82	<i>pgpA</i>	Phosphatidylglycerophosphatase A
PA14_17270	1,94	<i>accA</i>	Acetyl-CoA carboxylase carbocyltransferase subunit alpha
PA14_21370	4,78	<i>FadD1</i>	Long-chain-fatty-acid—CoA ligase
PA14_23860	1,66	<i>accD</i>	Acetyl-CoA carboxylase carbocyltransferase subunit beta
PA14_27730	14,26	<i>fadE</i>	Acyl-CoA dehydrogenase
PA14_70110	12,4		Cardiolipin synthase
PA14_71220	2,4	<i>Cls</i>	Cardiolipin synthase

Pour finir, un groupe conséquent de protéines impliquées dans le maintien de la cellule, la mobilité et l'attachement a été mis en évidence (**Tableau 7**).

Le complexe Tol formé par TolR, TolQ, TolB et TolA est enrichi dans la fraction DRM (**Tableau 4, Tableau 7**). Deux de ces protéines, soit TolR et TolQ ont aussi été retrouvées dans la fraction DRM chez *E. coli* (Guzmán-Flores et al., 2019). Ce complexe contribue au maintien de l'intégrité de la membrane et de la morphologie cellulaire (Llamas et al., 2003). Les protéines FtsE, FtsX, FtsH et ZipA, toutes les quatre enrichies dans les DRM, sont des protéines de la membrane interne essentielles à la formation de l'anneau septal qui précède la division de la cellule (Pichoff et al., 2019). Les protéines FtsE et FtsX sont en opéron et comme FtsH, la protéine FtsE possède une activité ATPase. La protéine transglycosylase A est impliquée dans le recyclage et la maintenance du peptidoglycane (Lamers et al., 2015). Des protéines ayant des rôles similaires ont été localisées dans la fraction DRM chez *E. coli* et *B. subtilis* (Bramkamp & Lopez, 2015; Guzmán-Flores et al., 2019; López & Kolter, 2010) .

Les protéines impliquées dans les appendices de *P. aeruginosa* en particulier dans la synthèse du flagelle et du pili de type IV sont particulièrement enrichies dans les DRM. La protéine FliL constituant le moteur du flagelle a d'ailleurs été incluse dans les familles des protéines SPFH grâce à son homologie structurale (Takekawa et al., 2019).

Tableau 7 Maintien de la cellule et mobilité			
Annotation	Fold change	Gene	Description
Maintien de la cellule			
PA14_04910	1,87	<i>ftsE</i>	Cell division ATP-binding protein FtsE
PA14_04920	5,82	<i>ftsX</i>	Cell division protein FtsX
PA14_22050	2,76	<i>htrB</i>	Lipid A biosynthesis
PA14_41400	3,14		Lipid A biosynthesis
PA14_44670	2,39	<i>zipA</i>	Cell division protein ZipA
PA14_48520	6,71		Membrane-bound lytic murein transglycosylase A
PA14_51740	14,46	<i>tolR</i>	Membrane protein TolR
PA14_51750	7,9	<i>tolQ</i>	Membrane protein TolQ
PA14_62860	5,44	<i>ftsH</i>	Cell division protein FtsH
Mobilité et attachement			
PA14_05360	2,4	<i>pilJ</i>	Twitching motility protein PilJ
PA14_14850	10,33	<i>pilF</i>	Type 4 fimbrial biogenesis protein PilF
PA14_45560	7,69	<i>motC</i>	Flagellar motor protein
PA14_45610	2,12	<i>cheZ</i>	bacterial flagellum-dependent swarming
PA14_45680	17,52	<i>flhA</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhA
PA14_45770	10,64	<i>fliP</i>	Flagellar biosynthesis protein FliP
PA14_45810	3,44	<i>fliL</i>	Flagellar basal body-associated protein FliL
PA14_50140	2,54	<i>fliF</i>	Flagellar MS-ring protein
PA14_58730	8,34	<i>pilA</i>	Type IV pilin structural subunit
PA14_58770	12,84	<i>pilD</i>	Type IV prepilin peptidase PilD
PA14_60280	5,78	<i>fimU</i>	Type IV fimbrial biogenesis protein FimU
PA14_60290	5	<i>pilW</i>	Type IV fimbrial biogenesis protein PilW
PA14_65430	3,78	<i>motB</i>	Flagellar motor protein MotB
PA14_65450	2,93	<i>motA</i>	Flagellar motor protein MotA
PA14_66630	6,33	<i>pilP</i>	Type IV fimbrial biogenesis protein PilP
PA14_66640	3,75	<i>pilO</i>	Type IV fimbrial biogenesis protein PilO
PA14_66650	3,94	<i>pilN</i>	Type IV fimbrial biogenesis protein PilN

III.3 Conclusion

La découverte des protéines SPFH p-flotillines chez les procaryotes a remis en question l'importance de la membrane dans les processus biologiques. D'abord perçue comme passive, elle est en réalité assimilable à une série de « plateformes » dispersées et dédiées à certains processus biologiques. La composition lipidique de ces plateformes est soigneusement sélectionnée pour favoriser la fonction, l'interaction ou l'oligomérisation des protéines qui y résident. Chez les eucaryotes ces plateformes appelées « lipid rafts » sont très bien connues et largement étudiées.

Grâce à la méthode d'extraction basée sur les propriétés lipidiques, une fraction DRM obtenue reflète l'enrichissement des protéines dans les lipid rafts. Chez les eucaryotes, les DRM sont enrichis en protéines impliquées dans le transport, la sécrétion et la signalisation. L'étude des

DRM procaryotes a débutée bien plus tard suite à la découverte des protéines homologues aux flotillines, protéines échafaudage constituant ces lipid rafts.

Chez les eucaryotes, les lipides majoritaires des lipid rafts sont le cholestérol et le sphingolipide tandis que chez les procaryotes la composition lipidique est encore imprécise bien que la présence de cardiolipine et d'hopanoïde ait été soulignée.

Les protéomes des DRM bactériens, étant enrichis en protéines impliquées dans le transport, la sécrétion et la signalisation, se sont révélés très similaires entre eux mais aussi similaires à ceux des eucaryotes, faisant naître la notion de « core proteome ». En parallèle, les études phénotypiques menées sur les p-flotillines ont mis en lumière une impressionnante variété de fonctions dans lesquelles elles sont impliquées : l'architecture des lipid rafts, le biofilm, la mobilité, la réponse au stress, la synthèse du peptidoglycane et par extension la morphologie *via* la modulation de la fluidité membranaire ou encore l'antibiorésistance. L'étude des DRM et des p-flotillines doit se poursuivre pour mieux comprendre les liens entre la composition lipidique des lipid rafts, les processus cellulaires enrichis et la fonction des p-flotillines.

Concernant *P. aeruginosa*, la protéine BacD serait une p-flotilline suggérant la présence de lipid rafts et donc de microdomaines fonctionnels au sein de sa membrane. Il n'existait à ce jour aucune étude concernant le protéome des DRM de *P. aeruginosa*, nous avons donc entrepris une analyse protéomique quantitative par approche label-free entre les DRM et les DSM.

La fraction DRM est enrichie à plus de la moitié en protéines localisées dans la membrane interne ou externe bien que quelques contaminants résidants dans le cytoplasme soient présents. Les DRM sont enrichis en protéines impliquées dans le transport, la sécrétion la signalisation et le métabolisme énergétique, ce qui est cohérent avec les protéomes déjà connus. En revanche, la protéine BacD n'a pas été retrouvée dans les DRM, or les flotillines et p-flotillines sont considérées comme résidentes dans cette fraction. En revanche, cette observation n'est pas vraie pour toutes les p-flotillines, YqjI, le p-flotilline de *B. subtilis* étant retrouvée également dans les DSM. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir la localisation de BacD dans l'une ou l'autre de ces fractions.

Nous retrouvons tout de même le « core protéome » caractéristique des DRM constitué, entre autres, des protéines SecY, SecD, YjC, FtsH et TatABC. D'autres protéines connues pour se trouver dans les DRM ont aussi été identifiées dans notre étude comme les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et dans la réponse aux stimuli.

Cette première étude donne une première vue d'ensemble de ce qui pourrait constituer les lipid rafts de *P. aeruginosa*. Ces travaux protéomiques constituent un socle sur lequel des futurs travaux doivent se baser. En effet, les auteurs des différentes études concernant les

DRM s'accordent sur la nécessité de vérifier la présence de ces protéines dans les DRM. En effet ces derniers se localisent préférentiellement aux pôles de la cellule. Les protéines préalablement identifiées peuvent être par exemple marquées à l'aide de marqueurs fluorescents puis observées en microscopie confocale. Enfin, une donnée cruciale concerne la composition lipidique de ces DRM. Cette dernière devrait être significativement enrichie de lipides spécifiques.

*Conclusion générale et
perspectives*

Depuis toujours, les bactéries ont développé des réponses adaptatives aux changements de leurs microenvironnements. Lors de ces changements, le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie membranaire est vital pour la bactérie car c'est un composant essentiel pour sa survie. En plus d'être l'unique barrière qui sépare la bactérie de son environnement extérieur, elle est le lieu de nombreux processus biologiques. La membrane abrite de nombreux systèmes de perception de signaux qui permettent à la bactérie de répondre rapidement et efficacement aux stress extra cytoplasmiques perçus. Ces systèmes sont regroupés sous le terme de CESR, le plus connu étant le système Psp d'*E. coli*. Ce système protecteur multiprotéique est non seulement impliqué dans la stabilisation de la membrane durant un stress mais est aussi impliqué dans la formation du biofilm, la virulence et l'antibiorésistance.

Bien que le système Psp d'*E. coli* soit le premier historiquement décrit chez les bactéries, il n'est pas exclusif à cette espèce. Des systèmes Psp ont été décrits chez d'autres espèces bactériennes comme *Y. enterocolitica*, *M. tuberculosis*, *B. subtilis*, chez les cyanobactéries mais aussi chez les plantes. Avec ces découvertes successives, la nécessité de comprendre l'évolution phylogénétique des différents acteurs de ce système a émergé. La protéine PspA, l'acteur clé, s'est révélée être la plus conservée parmi l'ensemble des acteurs du système. En conséquence, les environnements géniques entourant le gène codant PspA sont extrêmement variés. La liste des protéines homologues à PspA s'est donc rapidement étendue jusqu'à former la famille PspA/IM30.

Initialement supposé participer à la sécrétion de rhamnolipides ou à la transduction du signal, le système BAC de *P. aeruginosa* serait un de ces environnements géniques codant un système Psp original pouvant participer à la conservation de l'intégrité membranaire durant un stress.

Au départ composé des 4 protéines BacA, BacB, BacC et BacD, nous avons montré que le système BAC est en réalité composé de 6 protéines, BacE et BacF étant les deux protéines nouvellement incorporées. Ces six protéines forment l'opéron *bacABCDEF* dont l'expression est dépendante du facteur sigma σ^{54} .

La protéine BacA aurait un double rôle de chaperonne/régulateur, BacB, dont l'homologie avec PspA avait déjà été soulignée (Macé et al., 2008), fait partie de la famille PspA/IM30, les protéines membranaires BacC et BacD forment un nouveau couple NfeD-flotilline, BacE appartient à la superfamille des ATPases AAA+ et enfin BacF serait un membre de la famille des phospholipases D.

La protéine BacA, dont sa structure a été nouvellement élucidée par cristallographie, adopte une conformation caractéristique des protéines chaperonnes du SST3 et des protéines membres de la famille YbjN. Ces protéines sont impliquées dans des voies de régulation qui, par interactions protéines-protéines (donc à un niveau post-traductionnel), régulent positivement ou négativement l'expression des gènes cibles.

D'après cette homologie structurale et l'accumulation des autres protéines BAC observée lorsque BacA est absente, nous supposons que BacA, à l'image des chaperonnes du SST3 pourrait imposer une régulation *via* des interactions protéines-protéines qui séquestre l'activateur de la transcription.

La littérature suggère que le système BAC serait aussi régulé à un niveau traductionnel par le système Gac/Rsm (Brenic & Lory, 2009). En se basant sur ces deux niveaux de régulation, nous avons proposé un modèle de régulation de l'expression de *bacABCDEF* où BacA séquestrerait l'activateur de la transcription nécessaire pour l'expression de *bacABCDEF* et où RsmA bloquerait la traduction par compétition avec le site de fixation du ribosome.

La composition protéique du système BAC telle que décrite ici correspond à l'un des très nombreux environnements protéiques qui entourent PspA mais pour lequel aucune donnée expérimentale n'existe (Ravi et al., 2020). En revanche, une collaboration entre la protéine PspA et une flotilline a déjà été mise en évidence dans le cas du système Psp de *B. subtilis* et d'*E. coli*.

Ainsi, en se basant sur l'ensemble de nos résultats, sur la littérature citée et sur le fonctionnement des systèmes Psp, un modèle de fonctionnement du système BAC est proposé (**Figure 91**). Les protéines BacE et BacF ne sont pas représentées car nous considérons que les données récoltées les concernant sont encore insuffisantes pour pouvoir correctement discuter de leur rôle respectif.

Dans ce modèle, les protéines membranaires BacC et BacD jouent le rôle de protéines senseurs et sont localisées aux niveaux des pôles dans des régions spécifiques de la membrane, à l'image des protéines senseurs PspB et PspC d'*E. coli*. En sachant que les flotillines ont tendance à s'oligomériser et que cet état d'oligomérisation a été observé chez BacD (Ben Mlouka, 2014), c'est ainsi qu'elle est représentée dans le modèle. De plus, en raison des similitudes de structures avec les protéines SPFH HflK/C, BacD est représentée avec un ancrage à la membrane interne du côté périplasmique. En revanche, rien n'exclut que BacD soit en réalité ancrée dans la membrane interne mais du côté cytoplasmique. Quant à BacC, ses trois domaines transmembranaires sont représentés selon les prédictions bio-informatiques.

D'après le rôle des flotillines, il n'est pas impossible que cette région soit assimilable à un microdomaine fonctionnel enrichi par exemple en cardiolipines, lipides importants dans la signalisation (non représentés dans le modèle).

À l'état induit, BacA libère l'activateur de la transcription et en parallèle les petits ARNnc RsmYZ séquestrent RsmA permettant ainsi l'expression de *bacABCDEF*. À l'image de la flotilline YdjI du système Psp de *B. subtilis*, la flotilline BacD recrute BacB à la membrane. En considérant son homologie avec PspA et Vipp1 et le dimère observé, BacB, pourrait s'oligomériser pour former par exemple des structures en anneaux, en stacks voire en filaments afin de remodeler la membrane endommagée.

Dans ce modèle, l'une des questions concerne l'existence d'un mécanisme de remodelage chez BacB. Les protéines PspA et Vipp1 en tant que membre de la famille d'ESCRT-III remodelent la membrane en adsorbant la bicouche lipidique jusqu'à la fission ou la fusion de la membrane. La protéine BacB en tant qu'homologue structural pourrait posséder de telles propriétés.

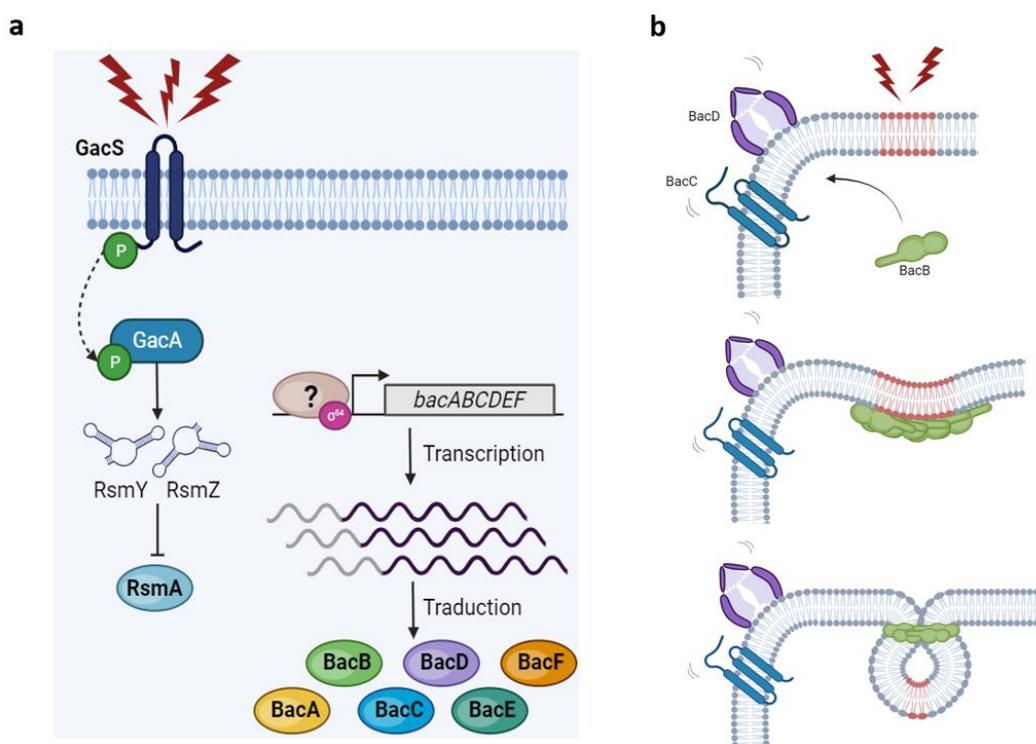


Figure 91 | Hypothèse de fonctionnement du système BAC
Voir le texte pour l'explication.

Ce modèle est à considérer avec prudence et n'est pour le moment qu'une hypothèse. Il sera bien sûr indispensable de vérifier chacune des hypothèses que nous avons émises.

Le modèle de fonctionnement du système BAC implique que les différentes protéines se situent à proximité l'une de l'autre. En s'inspirant de la littérature, des expériences de co-localisation par marquage fluorescent et observation par microscopie confocale seront à envisager pour confirmer cette hypothèse (Z. Yang et al., 2021).

La structure adoptée par PspA et Vipp1 est cruciale dans le mécanisme de remodelage. Celle de BacB est homologue suggérant un mécanisme d'action similaire. La purification de BacB est donc une piste prioritaire pour confirmer ses capacités d'oligomérisation et identifier ainsi ses différents états d'oligomérisation, s'ils existent. D'après les études concernant PspA et Vipp1, les possibles structures formées par BacB pourraient être observées par cryo-microscopie électronique.

Dans la continuité de ces travaux, il serait aussi très intéressant de mettre en contact BacB et des liposomes afin d'observer, toujours par cryo-microscopie électronique, des interactions avec les bicouches lipidiques, des phénomènes de fission ou de fusion.

Un des axes de recherche concerne aussi les facteurs d'induction du système, que nos premières investigations n'ont pas mis en évidence. Une technique plus sensible que le suivi de croissance serait l'utilisation de la qRT-PCR qui permet de suivre l'expression de gènes cibles en fonction de différentes conditions.

La recherche de ces facteurs d'induction est inévitablement liée au mécanisme de régulation de *bacABCDEF*. Nous avons proposé une hypothèse de régulation qui demande des investigations supplémentaires. L'identification de cet activateur de la transcription et d'un possible réseau d'interactions entre les différents acteurs BAC en font partie. En effet, de précédentes études montrent une forte interaction entre BacA et BacB (Ben Mlouka, 2014; Saffiedine, 2019) supposant un rôle de BacB dans cette régulation et/ou un rôle de BacA en tant que chaperonne pour le transport de BacB à la membrane.

Des états d'oligomérisation concernant BacD ont déjà été mis en évidence (Ben Mlouka, 2014). L'observation plus poussée de ces états d'oligomérisation pourrait aussi se faire à l'aide de la cryo-microscopie électronique, impliquant donc la purification de BacD. Les études sur BacD sont à l'état préliminaire et doivent se poursuivre. Au regard des premiers résultats, BacD semble jouer un rôle dans la fluidité membranaire. Cette fluidité pourrait être davantage investiguée grâce à la mise en contact de BacD avec des liposomes. La morphologie de la cellule est aussi liée aux flotillines. Cette morphologie a été investiguée chez $\Delta bacD$ par microscopie à force atomique mais n'a pour le moment pas donné de résultats concluants. L'observation de la cellule par microscopie électronique permettrait d'être plus résolutif.

Dans un autre registre, nous avons proposé le premier protéome des DRM de *P. aeruginosa*. BacD a été localisée dans la membrane (Ben Mlouka, 2014; Saffiedine, 2019) mais son appartenance aux DRM doit être investiguée. Ces travaux supplémentaires devront aussi confirmer l'appartenance des protéines citées à ces microdomaines fonctionnels. Là aussi, des expériences de co-localisation par microscopie à fluorescence sont envisagées.

D'une manière générale, l'étude bio-informatique ouvre de très nombreuses pistes quant à l'étude fonctionnelle et structurale des protéines BAC.

En partie grâce à sa polyvalence métabolique, sa résistance élevée aux antibiotiques et son vaste répertoire de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* est parfaitement adaptée pour prospérer dans une grande variété d'environnements. En sachant que les systèmes Psp sont cruciaux pour la survie de la bactérie, comprendre la régulation et le fonctionnement du système BAC permettrait d'ouvrir de nouvelles pistes d'études et d'identifier de potentielles cibles pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa*.

En effet, alors que les individus en bonne santé sont rarement infectés, ceux présentant de graves complications sont les cibles privilégiées de *P. aeruginosa*, faisant d'elle un pathogène opportuniste notoire. Parmi les cibles, les patients atteints de la mucoviscidose, d'un cancer, du SIDA, du diabète, de neutropénie (baisse de neutrophile) ou hospitalisés sur une longue durée présentent de haut risque d'infections à *P. aeruginosa*. Les infections sont graves et extrêmement variées allant de l'infection pulmonaire chez les patients atteints de maladies pulmonaires obstructives chroniques ou ventilés, à la septicémie, l'infection des tissus mous chez les brûlés et des plaies ouvertes en passant par les infections urinaires et les kératites.

Chez ces patients à risque, l'adoption d'un mode de vie biofilm par la bactérie au sein du tissu présage de fortes complications cliniques. Ces biofilms provoquent des infections chroniques qui, par leur persistance dans le tissu, sont associées à une forte morbidité et mortalité. En clinique, le traitement de ces infections est extrêmement difficile car les bactéries protégées au sein du biofilm échappent au système immunitaire et aux antibiotiques.

C'est pour toutes ces raisons que, face à l'urgence de la situation, l'OMS et le centre de contrôle des maladies ont classé *P. aeruginosa* en priorité N°1 pour la recherche et le développement des nouvelles thérapies antibactériennes.

Matériels et méthodes

I. Les souches bactériennes

La souche PA14 de *P. aeruginosa* sauvage appelée WT (wild-type) et les mutants associés ont été fournis par l'équipe du Pr. Ausubel de la Harvard Medical School de Boston. Les mutants proviennent d'une librairie de mutants construite par insertion du transposon MAR2xT7 (Liberati et al., 2006). Pour exercer une pression de sélection, le transposon contient une cassette de résistance à la gentamycine (15 µg/mL).

Les souches sont conservées à -80°C. Brièvement, une pré-culture est réalisée dans du bouillon LB (Luria Bertani, Difco) à 37°C pendant environ 18 heures (h). Un isolement sur une gélose LB agar (Difco) est réalisé afin de vérifier la pureté du souche. Une colonie est ensuite prélevée pour ensemercer une culture de 50 mL en milieu LB, en respectant le rapport volumétrique liquide-oxygène de 1/5^{ème}. Après 18 h d'incubation à 37°C, la culture est centrifugée à 5 000 x g pendant 20 minutes (min) (Sigma 3-16KL, Germany) et le culot bactérien est repris dans 5 mL d'un mélange de glycérol et de LB selon un rapport 1/3.

II. Les études de biologie moléculaire

II.1 Vérification de l'insertion du transposon MAR2xT7 par PCR

II.1.1 Choix des amorces et extraction de l'ADN

La taille du transposon MAR2xT7 est de 994 pb. Il est donc possible de comparer la taille du gène muté avec celle du sauvage par PCR (polymerase chain reaction). Les amorces ont été construites à l'aide du logiciel Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) et commandées auprès de Eurogentec (Belgique). Pour chaque mutant, le couple d'amorces est spécifique et se positionne de part et d'autre du transposon (Tableau 8). Les couples d'amorces sont construits en veillant à ne pas dépasser un pourcentage de GC d'environ 50% et à obtenir une température de fusion (Tm) proche entre les deux amorces.

Nom amorce	Séquence 5' → 3'	% GC	Tm (°C)	Taille (pb)
PA14_ΔbacD_F	CAAGGTGCATTTACCGGTG	55	62	20
PA14_ΔbacD_R	ATCACCTCGATGATGCGGTC	55	62	20
PA14_ΔbacB_F	GTGCTGCACGAAATCGAAAC	50	60	20
PA14_ΔbacB_R	TTGACCGTATCCACCTGTTGCTTG	50	52,3	24
PA14_ΔbacA_F	GCTCATTTGGAGAAGGAGGAAGAC	50	52,3	24
PA14_ΔbacA_R	TTTCAGGTAGCCGGCGTAGACTT	52,2	52	23

F : forward et R : reverse

La PCR est réalisée à partir d'une unique colonie obtenue après un isolement sur gélose LB. La colonie est reprise dans 50 µL d'eau puis chauffée à 95°C au bain sec pendant 5 min pour

lyser les bactéries. L'ADN est récupéré dans le surnageant après centrifugation à 2 500 x g pendant 5 min (Minispin Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany).

II.1.2 Paramètres du cycle PCR et migration sur gel d'agarose

Le mix PCR contient : 1 µL d'ADN, 1 µL du couple d'amorce chacune à une concentration de 20 µM, 34,8 µL d'eau, 10 µL de tampon (Bioline, Life Science® Compagny) et 0,25 µL d'ADN polymérase MyTaq™ Red RNA Polymerase (Bioline, Life Science® Compagny). Le cycle PCR est réalisé avec le thermocycleur Mastercycler® X50 (Eppendorf) selon le programme suivant : *i)* Dénaturation des brins d'ADN à 95°C pendant 1 min, *ii)* Hybridation des amorces à 60°C pendant 15 secondes (sec) et *iii)* Élongation des brins d'ADN à 72°C pendant 30 sec.

Pour visualiser les fragments d'ADN amplifiés, du SYBR Safe (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) est incorporé au gel d'agarose 1% (Sigma-Aldrich) préparé dans du TAE (tris acétate EDTA) (Sigma-Aldrich). La migration s'effectue avec 5 µL d'échantillon et sous un champ électrique de 150 Volt (V) dans du tampon TAE. Les marqueurs de poids moléculaires (Quick-Load Purple 100 bp DNA Leader, BioLabs) déposés sur le gel nous permettent de vérifier la taille des fragments d'ADN et ainsi valider l'insertion du transposon. Le gel est visualisé grâce au ChemiDOC MP Imaging System (BioRad, USA).

II.2 RT-PCR

Les manipulations décrites ci-dessous, en dehors de la PCR, ont été réalisées au laboratoire GlycoMEV UR 4358 (Université de Rouen Normandie) en collaboration avec le Dr. Marie-Christine KIEFER-MEYER.

II.2.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir d'une culture de la souche WT (à environ 10⁹ UFC/ml) grâce au kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Pour éviter la contamination par l'ADN, les échantillons d'ARN sont traités à la déoxyribonucléase grâce au kit TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. La concentration d'ARN est déterminée grâce au NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific). La présence de contaminants est vérifiée grâce aux rapports A_{260nm}/A_{280nm} (protéines) et A_{260nm}/A_{230nm} (autres contaminants). La valeur de ces deux rapports doit être comprise entre 2 et 2,2 pour considérer l'échantillon comme pur. L'échantillon d'ARN est aliquoté pour obtenir une quantité finale de 2 µg. Les aliquots sont conservés à -80°C.

II.2.2 RT des ARN en ADNc

L'ADNc (ADN complémentaire) est obtenu par transcription inverse ou RT (reverse transcription) à partir d'un aliquot grâce au kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. La RT, effectuée dans le thermocycleur (Veriti, Applied Biosystems ; SimpliAmp, ThermoFisher) suit le programme suivant : *i*) Production des ADNc à 37°C pendant 2 h, *ii*) Ouverture des structures secondaires à 50°C pendant 10 min et *iii*) Arrêt de la synthèse à 70°C pendant 5 min.

II.2.3 PCR et migration sur gel d'agarose

Les ADNc sont amplifiés par PCR. Les amorces ont été construites à l'aide du logiciel Primer3 et commandées auprès de Eurogentec (**tableau 9**). Les couples d'amorce ciblent les régions intergéniques des gènes *PA14_16140*, *16150*, *16160*, *16180*, *16190* et *16200*.

Nom amorce	Séquence 5'→ 3'	% GC	Tm (°C)	Taille (pb)
PA14_16140-50_F	TTCAACGAAGAGGTCCTGCT	50	60	20
PA14_16140-50_R	AGCTTGCTCCATACCGTCAT	50	60	20
PA14_16150-60_F	TACGGCAACTCGAAGAGCAA	50	52,3	24
PA14_16150-60_R	ACGCCGTTGAGTTTCAGCTT	50	52,3	24
PA14_16160-80_F	CCGGGCTGATCCTGAAAGTT	55	62	20
PA14_16160-80_R	GATCACCTCGATGATGCGGT	55	62	20
PA14_16180-90_F	CGAGGGCGACTTCTTCAACT	55	62	20
PA14_16180-90_R	GCGATGCAGTTGTTTTCGGT	50	60	20
PA14_16190-200_F	TGATCAAGGTGATGGACCGC	55	62	20
PA14_16190-200_R	GTCCAATCCGTCGAAGTCCA	55	62	20

La préparation du mix PCR, le paramétrage du cycle PCR et la migration sur gel d'agarose sont réalisés comme décrit ci-dessus (cf Section II.1.2).

III. Les études phénotypiques

III.1 Courbes de croissance

Les courbes de croissance sont réalisées selon différentes conditions décrites ci-dessous.

III.1.1 Croissance en LB seul

À partir d'une préculture, une plaque 24 puits (SPL Life Science) contenant 2 mL de LB par puit estensemencée avec 10^6 UFC/mL de bactéries ce qui correspond à une absorbance à 600 nm de 0,01. La plaque est placée dans une cassette d'humidité pour éviter l'évaporation et ce montage est placé dans un lecteur de plaque SPARK® multimode (TECAN Group Ltd. Männedorf, Suisse) capable de maintenir une température constante de 37°C. Les mesures d'absorbance se font à la longueur d'onde de 600 nm (A_{600}) toutes les 15 min pendant 48 h.

Les résultats représentent la valeur moyenne de l' $A_{600} \pm$ SEM (standard error of the mean) d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants.

III.1.2 Croissance en condition de stress

Dans la première méthode, la molécule de stress est ajoutée en début de croissance. Une plaque 24 puits (SPL Life Science) contenant 2 mL de LB par puit estensemencée avec 10^6 UFC/mL de bactéries. Le LB est à pH 9 ou supplémenté avec les différentes molécules selon le **Tableau 10**. La plaque 24 puits est placée dans la cassette d'humidité et la croissance est suivie par mesure d'absorbance (A_{600}) toutes les 15 min pendant 48 h comme décrit précédemment (cf Section III.1.1).

Dans la seconde méthode, la molécule de stress est ajoutée au milieu de la phase exponentielle de croissance. Une plaque 24 puits (SPL Life Science) contenant 2 mL de LB par puit estensemencée avec 10^6 UFC/mL de bactéries puis placée dans la cassette d'humidité.

La croissance est suivie comme précédemment. Les différentes molécules sont ajoutées selon le **Tableau 10** lorsque la valeur d' A_{600} de 0,25 est atteinte. La croissance est suivie par mesure d'absorbance (A_{600}) toutes les 15 min pendant 24 h comme décrit précédemment (cf Section III.1.1).

Pour ces deux méthodes, la plaque contient également des puits « contrôle négatif » (LB seul) et des puits « contrôle positif » (LBensemencé, non supplémenté).

Les résultats représentent la valeur moyenne de la $A_{600} \pm$ SEM d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants.

Stress	Molécule	Concentration	Fournisseur
Osmotique	NaCl	0,2M ; 0,5M ; 0,75M	Sigma-Aldrich
	Sucrose	0,2M ; 0,5M ; 1M	Sigma-Aldrich
Alcalin	NaOH	10 mM ; 30 mM	Sigma-Aldrich
Éthanoïque	Éthanol	1% ; 2%	VWR

III.2 H₂O₂ et sucrose killing

À partir d'une pré-culture, un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de LB estensemencé avec 10⁶ UFC/mL de bactéries et est incubé à 37°C sous agitation (40 rpm). Lorsque la DO₆₀₀ atteint une valeur proche de 0,25, l'H₂O₂ ou le sucrose sont ajoutés respectivement à une concentration de 100 mM et de 7 M. La culture est de nouveau placée à 37°C pendant 1 heure. Des numérations sont régulièrement réalisées (T_{0h}, T_{0,5h} et T_{1h}) par comptage sur gélose LB. Les géloses sont placées à 37°C pendant 24 h et les UFC/ml sont dénombrées. Un erlenmeyer contrôle est traité de façon identique, mais sans ajout d'H₂O₂ ou de sucrose.

Les résultats représentent la valeur moyenne des UFC/mL ± SEM obtenue à partir d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants. Les comptages sont réalisés à partir de trois réplicats techniques.

III.3 Mobilités sur milieu semi-solide

Les mobilités swarming et swimming sont réalisées selon les protocoles suivants : (Ha et al., 2014b, 2014a). Le milieu M9 (Sigma-Aldrich) est supplémenté avec 1 mM de MgSO₄, 0,2% de glucose (Sigma-Aldrich), 0,5% de caséine (Sigma-Aldrich). Pour le swimming et le swarming ce sont respectivement 0,3% et 0,5% d'agar technique qui sont utilisés. Les géloses sont inoculées avec 2 µL d'une culture bactérienne âgée de 24 h (milieu LB), sans que le cône ne touche la gélose pour le swimming et en touchant délicatement la gélose avec le cône pour le swarming. Les géloses sont incubées à 37°C durant 16 h puis les diamètres de migration sont mesurés à partir du point d'inoculation.

Les résultats représentent la valeur moyenne en cm ± SEM d'au moins 5 réplicats biologiques indépendants eux même issus de 5 réplicats techniques. Les données sont analysées par un test statistique de Student.

III.4 Mesure de la fluidité membranaire par anisotropie

L'anisotropie permet d'évaluer la fluidité membranaire grâce à la mesure de la dépolarisation de fluorescence. Pour cela, des sondes fluorescentes sont insérées dans la membrane. À l'état excité, les changements de direction du faisceau induisent une dépolarisation partielle ou totale de la fluorescence. En d'autres termes, si la membrane est très fluide, la sonde sera très mobile et donc la fluorescence émise sera fortement dépolarisée. À l'inverse, si la membrane est rigide, la sonde DPH sera plutôt statique et la fluorescence émise sera fortement polarisée. Plus la fluorescence est dépolarisée plus la valeur d'anisotropie est petite et inversement.

À partir d'une pré-culture, 10^6 UFC/mL de bactéries sontensemencées dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de LB. La culture est incubée à 37°C sous agitation (140 rpm) pendant 24 h puis les bactéries sont récupérées après centrifugation à 7 500 x g pendant 5 min (Sigma 3-16KL, Germany). Le culot bactérien est lavé trois fois avec une solution de $MgSO_4$ à 10 mM. Deux mL d'une suspension bactérienne à une absorbance A_{600} de 0,1, (10^7 UFC/mL) sont préparés dans du $MgSO_4$ à 10 mM puis sont divisés en deux. Le premier mL de la suspension correspond au contrôle négatif (bactéries non exposées à la sonde DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène)) et permet d'obtenir la fluorescence basale des échantillons. Dans le second mL de la suspension, 1,5 μ L de sonde DPH à 4 mM préparée dans du TFA (trifluoroacetic acid), sont ajoutés.

Deux cent μ L de chacune des suspensions sont placés dans une plaque 96 puits à fond noir et incubés pendant 1 h à 37°C à l'abri de la lumière.

La mesure de la fluorescence est effectuée avec le lecteur de plaque SPARK® multimode (TECAN Group Ltd. Männedorf, Suisse) selon la méthode « fluorescence polarisation ». L'excitation de la sonde est réalisée à 365 nm et son émission de fluorescence est à 425 nm. Le G-factor est réglé en mode « calibrated », un puit contenant le contrôle négatif sert de blanc de référence et un puit contenant les cellules marquées au DPH sert de fluorescence de référence.

La valeur d'anisotropie (r) est fournie par le logiciel mais elle peut aussi se calculer de la façon suivante :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$$

- $I_{//}$: représente l'intensité de fluorescence émise parallèlement au rayon incident
- I_{\perp} : représente l'intensité de fluorescence émise perpendiculairement au rayon incident

Les résultats représentent la valeur moyenne \pm SEM obtenue à partir d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants contenant chacun 4 réplicats techniques. Les données sont analysées par un test statistique de Mann Whitney.

III.5 Mesure de l'adhésion bactérienne sur les cellules pneumocytaires A549

Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain de la lignée A549 ATCC sont cultivées en monocouche dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Lonza, BioWhittaker®) ou dans un mélange nutritif F-12 de Ham pendant au moins 20 jours pour permettre la différenciation en un phénotype de type alvéolaire II (ATII). Le milieu de culture est complété avec 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur, 100 unités/mL de pénicilline G et 100 μ g/mL de streptomycine (Cooper et al., 2016). La culture des cellules se fait à 37°C sous une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂.

Les cellules sont ensuite trypsinisées et transférées dans une plaque 24 puits jusqu'à obtention d'une monocouche de 10⁵ cellules/puit. Après 24 h de culture dans les conditions décrites précédemment, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (phosphate buffer saline) puis du milieu frais dépourvu d'antibiotiques est ajouté. Les souches de *P. aeruginosa*, sont déposées au contact des cellules selon un rapport bactéries/cellules de 100:1, ce qui correspond à une multiplicité d'infection ou MOI (multiplicity of infection) de 100. L'infection est réalisée à 37°C sous atmosphère de 5% de CO₂ pendant 2 h.

Après infection, deux paramètres sont mesurés : l'adhésion bactérienne et la densité des cellule A549 (cf Section IV.1).

Pour déterminer le nombre de bactéries adhérentes aux cellules, ces dernières sont lavées deux fois au PBS puis lysées avec 0,5% de Triton X-100. La suspension obtenue est diluée en série puis 10 μ L de chaque dilution sont déposés sur une gélose LB. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies sont dénombrées et le pourcentage d'adhésion est calculé en divisant le nombre d'UFC/mL final (soit après les deux heures d'infection) par le nombre initial d'UFC/mL.

Les résultats représentent la valeur moyenne du pourcentage d'adhésion \pm SEM d'au moins trois réplicats biologiques indépendants. Les données sont analysées par un test statistique de Mann Whitney.

IV. Les études microscopiques

IV.1 Mesure de la densité cellulaire par comptage

Les cellules A549 sont cultivées sur une lamelle ronde (0,8 cm de diamètre) placée dans une plaque 24 puits selon les conditions décrites ci-dessus (cf Section III.5). Après infection (cf Section III.5), la lamelle est lavée trois fois au PBS (préalablement chauffé à 37°C) pour éliminer les bactéries et les cellules A549 non adhérentes et/ou détachées du support.

Avant l'observation au microscope, la lamelle est colorée avec le DAPI et la phalloïdine rhodamine (ActinRed™ 555 ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific)) pendant 20 min en suivant les recommandations du fournisseur. Le DAPI, en se fixant à l'ADN, colore en bleu les bactéries et le noyau des cellules A549 tandis que la phalloïdine rhodamine colore en rose le cytosquelette d'actine.

Les acquisitions sont effectuées sur la plateforme PRIMACEN grâce au microscope confocal Leica TCS SP8 CFS (Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé de diode laser (Coherent, Les Ulis, France). Pour observer les bactéries adhérentes aux cellules A549, un objectif à immersion à l'huile de x63 est utilisé, tandis qu'un objectif de x20 est utilisé pour la quantification de la densité cellulaire. Le DAPI est excité à 405 nm et la phalloïdine rhodamine à 552 nm. Les émissions de fluorescence sont captées entre 540 et 500 nm pour le DAPI et entre 570 et 620 nm pour la phalloïdine rhodamine. Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane, Suisse). La densité cellulaire est quantifiée automatiquement à l'aide de la fonction de détection des spots fluorescents (**Figure 92**). Les lamelles des cellules A549 non infectées sont utilisées comme contrôle négatif (densité considérée à 100%). Le pourcentage de densité cellulaire des cellules A549 infectées est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Densité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de spot}}{\text{Nombre de spot}_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Les résultats représentent la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants contenant chacun au moins 10 acquisitions. Les données sont analysées par un test statistique de Mann Whitney.

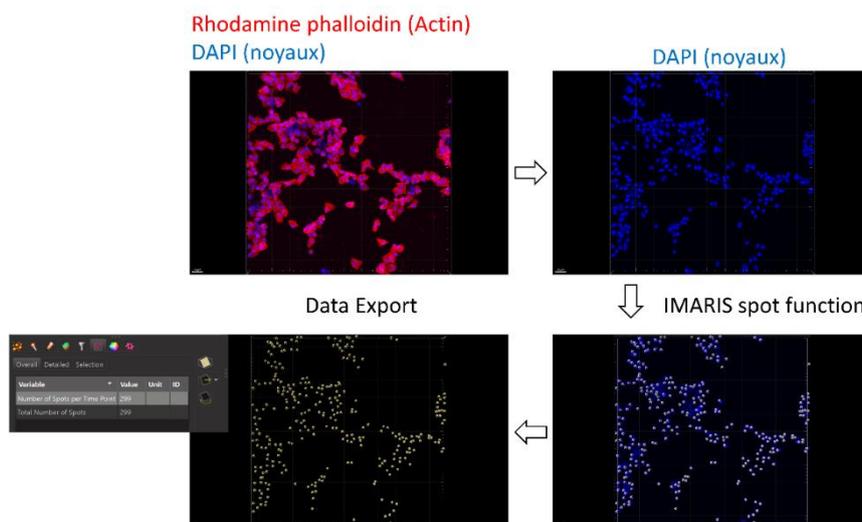


Figure 92 | Quantification de la densité cellulaire avec la fonction "spot" du logiciel IMARIS.

La densité cellulaire est quantifiée uniquement sur le canal fluorescent DAPI. La fonction "spot" détecte automatiquement les tâches de noyaux cellulaire représentées par des sphères grises. Le nombre de tâches détectées peut être exporté à l'aide de la fonction statistique.

IV.2 Observation des biofilms à l'interface solide-liquide par microscopie confocale et quantification de la biomasse

Les biofilms sont formés sur une lame Lab-Tek™ Permanox étanche (System Nunc™, ThermoFisher Scientific) et sont observés à des temps spécifiques choisis selon l'étude.

Pour permettre l'adhésion des bactéries sur la lame, une suspension bactérienne de 10^6 UFC/mL est préparée dans 1 mL de PBS puis déposée sur la lame. Après 2 h d'incubation à 37°C en statique le PBS est retiré en retournant délicatement la lame. Dans le cas où l'observation microscopique est effectuée juste après les 2 h d'adhésion, aucun milieu de culture n'est ajouté et la lame est traitée comme décrit ci-dessous. Sinon, 1 mL de milieu de culture LB est ajouté avec précaution et la lame est une nouvelle fois incubée à 37°C dans le noir sans agitation.

À des temps de culture définis, le milieu de culture est retiré et les biofilms sont lavés trois fois avec du PBS, à chaque étape les solutions sont retirées par retournement. La lame est ensuite marquée au Syto9 (ThermoFisher Scientific) pendant 20 min dans le noir (pour 2 mL final de solution de marquage 3 µL de Syto9 sont ajoutés). Le syto9 est retiré et la lame est lavée deux fois au PBS. Une goutte de milieu de montage Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) est ajoutée avant de déposer la lamelle. La lame est stockée dans le noir pendant au minimum 2 h, puis observée au microscope confocal le jour même et au plus tard le lendemain.

Les acquisitions sont effectuées grâce au microscope confocal Leica TCS SP8 CFS (Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé de diode laser (Coherent, Les Ulis, France). Le Syto9

est excité à une longueur d'onde de 488 nm et l'émission de fluorescence est captée selon une bande passante allant de 500 à 540 nm par un détecteur hybride (Leica Microsystems, Nanterre, France) selon le mode de comptage photonique. Les reconstitutions 3D et la quantification du biovolume sont réalisées avec le logiciel Imaris (Bitplane, Switzerland).

Les résultats représentent la valeur moyenne du biovolume \pm SEM obtenue à partir d'au moins trois réplicats biologiques contenant chacun au moins 6 acquisitions. Les données sont analysées par un test statistique de Mann Whitney.

V. L'étude des rhamnolipides

V.1 Préparation des échantillons

À partir d'une pré-culture, un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de LB estensemencé avec un inoculum de départ de 10^7 UFC/mL. La culture est placée à 37°C sous agitation (140 rpm). Toutes les 2 h pendant 12 h puis à 24 h et à 48 h, les bactéries sont énumérées par comptages sur géloses LB afin de rapporter la quantification des rhamnolipides à une concentration bactérienne.

À ces mêmes temps de culture, 1 mL de culture est collecté et centrifugé à 9 000 x g pendant 15 min (Sigma 3-16KL, Germany). Le surnageant est récupéré puis filtré deux fois sur une membrane PVDF de diamètre 0.22 μ m de taille de pores (Millex-GP, Merck Millipore Ltd, Ireland). Le surnageant filtré est stocké à -20°C jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse. La collecte du surnageant et le dénombrement des colonies sont réalisés à partir trois cultures indépendantes. Pour un réplicat biologique, trois réplicats techniques sont réalisés.

V.2 Analyse par spectromètre de masse 6545XT AdvanceBio Q-TOF

Afin de rentrer dans la gamme linéaire du spectromètre de masse, les surnageant prélevés aux temps de culture donnés ci-dessus, sont dilués respectivement par deux et par dix. Ces dilutions sont effectuées dans des vials en verre avec une solution contenant 30% (v/v) d'acétonitrile (ACN), 70% (v/v) d'eau et 4 mM d'acétate d'ammonium.

Les conditions analytiques décrites ci-dessous sont adaptées de méthodes publiées dans la littérature (Bazire et al., 2005; Déziel et al., 2000) et optimisées par le Dr. Laurent Coquet du laboratoire du PBS.

Un microlitre d'extrait dilué est injecté et les molécules sont séparées par le système chromatographique UHPLC (ultra-high performance liquid-chromatographic) 1290 Infinity II (Agilent Technologies). La phase mobile A contient de l'eau et 4 mM d'acétate d'ammonium et la phase mobile B contient un mélange ACN/eau selon un rapport 90/10 (v/v) et 4 mM d'acétate d'ammonium. La séparation est réalisée en phase inverse avec une colonne Zorbax SB-C18 Rapid Resolution (4,6 mm ID x 5 mm, 3,5 μ m, 80 Å, Agilent, USA). Le gradient de

séparation est réalisé à un débit de 750 $\mu\text{L}/\text{min}$ selon les conditions suivantes : 40% de B de 0 à 3 min, 40% à 90% de B de 3 à 16 min, 90% de B de 16 à 18 min, 90% à 40% de B en 12 sec et 40% de B pendant 1 min et 48 sec.

Le système UHPLC est couplé à un spectromètre de masse 6545XT Advance-Bio Q-TOF (Agilent Technologies, USA). Au niveau de la source ESI chauffée à 200°C, les molécules sont ionisées en mode négatif. La tension du capillaire et du fragmenteur sont respectivement de 3.5 kV et 175 V. L'analyse est réalisée en mode MS/MS. Les ions sont analysés dans le TOF ($R= 40\ 000$) sur une gamme de masse allant de 50 à 1500 m/z . La fragmentation MS2 des ions précurseurs est réalisée en mode CID (collision-induced dissociation) avec une énergie de collision allant de 5 à 25 V. Les ions fils sont analysés dans le TOF ($R = 40\ 000$).

L'analyse MS permet de quantifier le rhamnolipide tandis que l'analyse MS2 permet de confirmer l'identité du rhamnolipide quantifié au regard des spectres de fragmentation. Préalablement à l'étude des échantillons, un mélange commercial de rhamnolipides de *P. aeruginosa* (R95MD ; Sigma-Aldrich) a été analysé par spectrométrie de masse afin de valider la méthode. L'analyse MS de ce mélange nous a permis d'associer à chaque rhamnolipide un m/z et un temps de rétention théorique afin d'établir une liste d'inclusion. L'analyse MS2 se fait en mode ciblée, c'est-à-dire que le spectromètre de masse va sélectionner pour la fragmentation uniquement le(s) ions répondant aux critères de masse m/z et de temps de rétention indiqués dans la liste d'inclusion. Les ions fils permettent d'établir une signature spécifique de chaque rhamnolipide, en d'autres termes sa « carte d'identité ».

V.3 Traitement des données avec le logiciel Mass Hunter Qualitative Analysis pour l'identification et la quantification

Le logiciel MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00 ; Agilent) permet de visualiser les données MS et MS2 et de les traiter.

La **Figure 93** résume la méthode employée pour quantifier et identifier les rhamnolipides en prenant comme exemple le Rha-Rha-C₁₀-C₁₀.

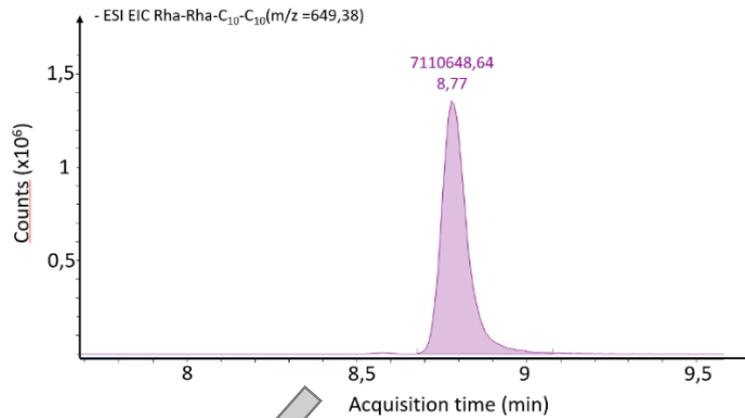
Les rhamnolipides sont détectés par extraction des pics EIC (extracted ion chromatogram) de leurs $[\text{M-H}]^-$ m/z respectifs à partir des spectres MS. Les m/z de chaque rhamnolipide sont indiqués dans le **Tableau 11**. L'aire sous la courbe du pic EIC est reportée sur une courbe étalon afin d'obtenir son équivalence en quantité. Cette courbe étalon a été établie à partir du mélange commercial de rhamnolipides. Différentes quantités (2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 et 150 ng) ont été injectées et l'aire sous le pic EIC est relevée pour chaque rhamnolipide. La proportion de chaque rhamnolipide a été déterminée en calculant le rapport

entre l'aire individuelle et la somme de toutes les aires relevées. Ces valeurs ont ensuite été rapportées en ng sur la base de la quantité totale du mélange commercial.

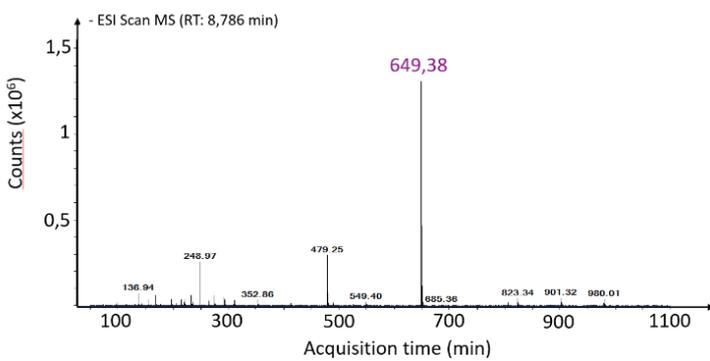
Durant l'analyse par spectrométrie de masse, le mélange commercial est injecté avant, pendant et en fin d'analyse afin de vérifier que les conditions d'analyse restaient optimales.

D'après le **Tableau 11**, quelques rhamnolipides, par exemple le Rha-C₁₀-C₁₀ et le Rha-C₈-C₁₂, ont un m/z identique. Ces isomères ayant une même masse ont un temps de rétention identique et ne sont donc pas séparés. Dans ce cas, l'aire sous le pic EIC prend en compte la présence de l'ensemble de ces isomères. La présence de chacun des isomères est vérifiée grâce à l'analyse des ions fragments provenant des spectres MS2.

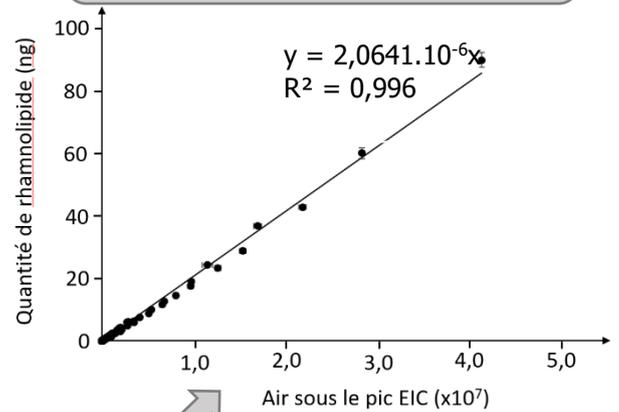
1) Extraction du pic EIC



2) Vérification de la présence du m/z sous le pic



4) Détermination de la quantité grâce à la gamme étalon



3) Confirmation de l'identité du rhamnolipide par les ions fils obtenus en MS2

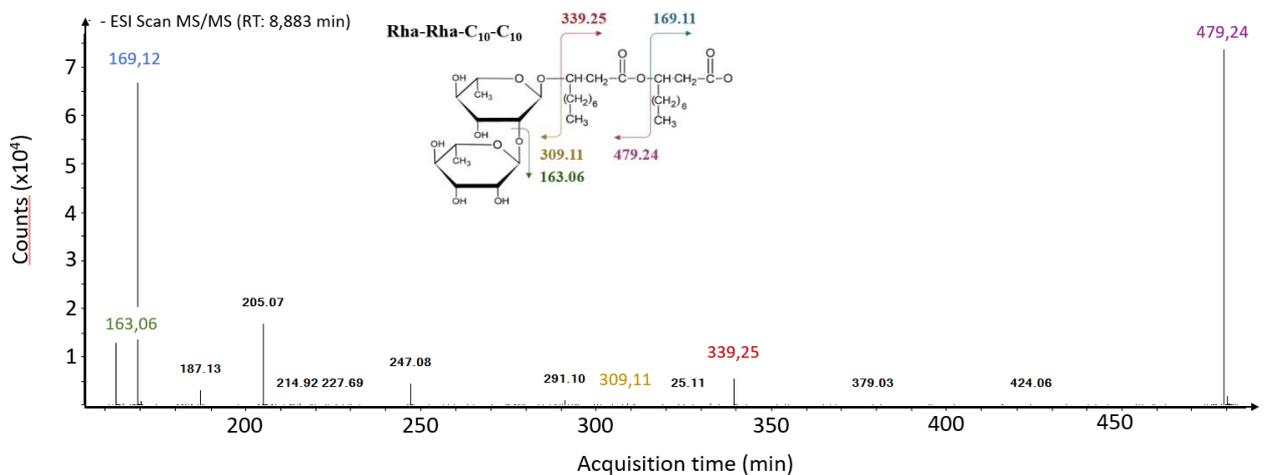


Figure 93 | Méthode analytique employée pour l'étude des rhamnolipides.

Tableau 11 Liste des rhamnolipides et de leurs (m/z) recherchés dans l'étude.		
Rhamnolipides	[M-H] (m/z)	Abréviation
Mono-rhamnolipides		
Rha-C ₁₀	333,20	R1
Rha-C ₁₂	361,23	R2
Mono-rhamno-di-lipides		
Rha-C ₈ -C ₁₀ / Rha-C ₁₀ -C ₈	475,29	R3
Rha-C ₁₀ -C _{10:1} / Rha-C _{10:1} -C ₁₀ Rha-C ₈ -C _{12:1} / Rha-C _{12:1} -C ₈	501,31	R4
Rha-C ₁₀ -C ₁₀ Rha-C ₈ -C ₁₂ / Rha-C ₁₂ -C ₈	503,32	R5
Rha-C ₁₀ -C ₁₁ / Rha-C ₁₁ -C ₁₀ Et/ou Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	517,33	R6
Rha-C ₁₀ -C _{12:1} / Rha-C _{12:1} -C ₁₀	529,33	R7
Rha-C ₁₀ -C ₁₂ / Rha-C ₁₂ -C ₁₀	531,35	R8
Rha-C ₁₂ -C _{12:1} / Rha-C _{12:1} -C ₁₂ Rha-C ₁₀ -C _{14:1} / Rha-C _{14:1} -C ₁₀	557,37	R9
Rha-C ₁₂ -C ₁₂ Rha-C ₁₀ -C ₁₄ Rha-C ₁₄ -C ₁₀	559,38	R10
Di-rhamno-di-lipides		
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	507,27	R11
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈ / Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	621,34	R12
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1} / Rha-Rha-C _{10:1} -C ₁₀ Rha-Rha-C ₈ -C _{12:1} / Rha-Rha-C _{12:1} -C ₈	647,36	R13
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ Rha-Rha-C ₈ -C ₁₂ / Rha-Rha-C ₁₂ -C ₈	649,38	R14
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₁ / Rha-Rha-C ₁₁ -C ₁₀ Et/ou Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	663,40	R15
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1} / Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	675,39	R16
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂ / Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	677,41	R17
Rha-Rha-C ₁₂ -C _{12:1} / Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₂ Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1} / Rha-Rha-C _{14:1} -C ₁₀	703,42	R18
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂ Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₄ / Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₀	705,44	R19

VI. Les études protéomiques

VI.1 Extraction des protéines intracellulaires

VI.1.1 À partir d'une culture planctonique

La culture est centrifugée à 7200 x g pendant 15 min (Sigma 3-16KL, Germany) et le culot bactérien est lavé trois fois avec du PBS (10 mL de PBS par lavage et centrifugation à 9 000 x g pendant 15 min). Le culot obtenu après le dernier lavage est pesé puis remis en suspension dans le tampon maison appelé R2D2 et supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 pastille/10 mL, ThermoFisher Scientific) selon un rapport 1/1 (1 g de culot pour 1 mL de tampon). Le tampon dénaturant appelé R2D2 est composé de 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 2 mM de TBP (tri-N-butylphosphine), 20 mM de DTT (dithiothreitol), 0,5%(w/v) de C7BzO (3-(4-heptyl) phenyl-3- hydroxypropyl) dimethylammoniopropanesulfonate), 2% (w/v) de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate hydrate. La suspension subit trois cycles de congélation à 20°C et décongélation à 37°C puis lysée par sonication pendant 10 min selon le cycle suivant : 3 sec pulse ON/ 3 sec pulse OFF à une amplitude de 24%. Le lysat est centrifugé à 12 000 x g pendant 30 min à 4°C (Sigma 3-16KL, Germany) pour séparer l'extrait protéique des débris cellulaires.

Les extraits protéiques sont conservés dans la glace et sont dosés le jour même de leur extraction.

VI.1.2 À partir d'une culture biofilm

Les biofilms sont formés selon le protocole décrit dans la section IV.2. Après 48 h d'incubation de la lame à 37°C dans le noir sans agitation, le milieu de culture est retiré et la lame est lavée deux fois avec du PBS puis séchée quelques secondes par le flux d'air du poste de sécurité microbiologique. Les biofilms sont décrochés de la lame grâce à une sonication de 5 min dans le tampon R2D2. La suspension subit trois cycles de congélation à 20°C et décongélation à 37°C puis lysée par sonication pendant 10 min selon le cycle suivant : 3 sec pulse ON/ 3 sec pulse OFF à une amplitude de 24%. Le lysat est centrifugé à 12 000 x g pendant 30 min à 4°C (Sigma 3-16KL, Germany) pour séparer l'extrait protéique des débris cellulaires.

Les extraits protéiques sont conservés dans la glace et sont dosés le jour même de leur extraction.

VI.1.3 Extraction des DRM et des DSM

La culture est centrifugée à 7200 x g pendant 30 min (Sigma 3-16KL, Germany) et le culot bactérien est lavée trois fois avec du PBS (10 mL de PBS par lavage et centrifugation à 9 000 x g pendant 15 min). Le culot obtenu après le dernier lavage est pesé puis remis en suspension dans du PBS supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 pastille/10 mL, ThermoFisher Scientific) selon un rapport 1/1. La suspension subit trois cycles de congélation à 20°C et décongélation à 37°C puis lysée par sonication pendant 10 min selon le cycle suivant : 3 sec pulse ON/ 3 sec pulse OFF à une amplitude de 24%. Le lysat est centrifugé à 12 000 x g pendant 30 min à 4°C (Sigma 3-16KL, Germany) pour séparer l'extrait protéique des débris cellulaires. Le surnageant est ultracentrifugé à 40 000 rpm pendant 1 h à 4°C. Le culot contenant la fraction membranaire est traité grâce au kit CellLytic MEM protein extraction (Sigma-Aldrich). Six cent µL de tampon « lysis and separation » froid sont ajoutés au contact du culot et la suspension est placée sur un agitateur orbital à 4°C sur la nuit. Le lendemain, la suspension est placée à 37°C (bain sec) pendant 30 min puis centrifugée 3 min à 3000 x g. À la sortie de la centrifugation, deux phases sont visibles : celle du dessus correspond à la fraction DSM et celle du dessous correspond à la fraction DRM. La fraction DSM est transférée dans un tube propre et la fraction DRM subit trois cycles chacun composé de 3 étapes : *i*) ajout de 400 µl de tampon « wash », *ii*) incubation 30 min dans la glace, *iii*) incubation 30 min à 37°C, *iv*) centrifugation à 3000 x g pendant 3 min puis retirer la phase du dessus, retour à l'étape *i*). La fraction DRM une fois lavée ne doit plus retourner dans la glace. Les fractions DRM et DSM sont dosées le jour même de leur extraction.

L'extraction des DRM et des DSM a été réalisée à partir de 5 réplicats biologiques.

VI.2 Détermination de la concentration protéique par dosage de Bradford

La concentration protéique est déterminée par le dosage de Bradford. Son principe repose sur la détection du changement d'absorbance opéré par le bleu de Coomassie contenu dans le réactif de Bradford. En effet, lorsque le bleu de Coomassie est libre sous sa forme cationique il est de couleur rouge foncé et son absorbance se situe aux alentours de 465 nm. Au contact des protéines, le bleu de Coomassie, se complexe aux acides aminés basiques comme l'arginine, l'histidine et la lysine et aux groupements hydrophobes des acides aminés. Cette complexation entraîne un changement de couleur qui vire au bleu, absorbant cette fois-ci à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié aux protéines. Grâce à une gamme étalon de concentration connue, il est possible de relier l'absorbance mesurée à une concentration (loi de Beer-Lambert).

La gamme étalon est préparée à partir d'albumine de sérum bovin ou BSA (bovin serum albumine) (Sigma-Aldrich) selon la **Figure 94**.

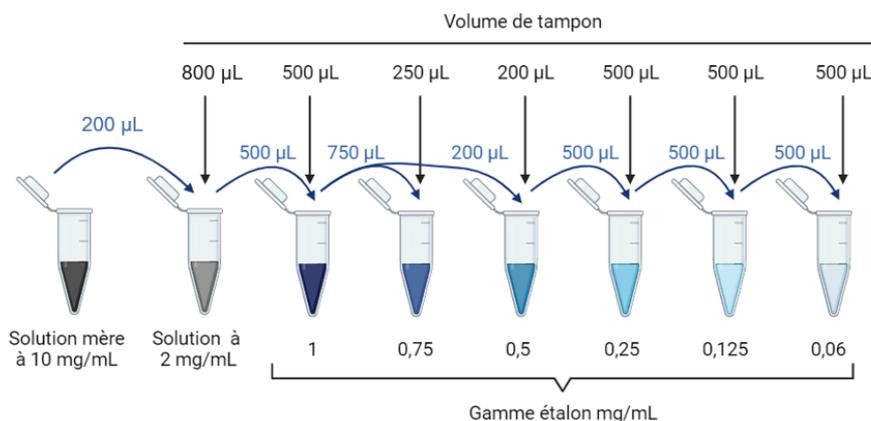


Figure 94 | Préparation de la gamme étalon pour réaliser le dosage de Bradford.

Pour que l'absorbance des échantillons protéiques se situe dans la gamme linéaire de la gamme étalon, ils sont dilués par deux, par dix et par vingt. Dix microlitres de chaque dilution et de la gamme étalon sont mélangés à 490 µL de réactif de Bradford (BioRad). Enfin, 200 µL de volume réactionnel sont déposés dans une plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à 595 nm grâce au lecteur de plaque VICTOR3 (Perkin Elmer).

N.B : la gamme étalon, les dilutions des échantillons protéiques et le blanc sont réalisés dans le tampon d'extraction des protéines.

Suite au dosage et si besoin, les échantillons protéiques sont préparés en vue d'une migration électrophorétique. Les échantillons protéiques sont finalement stockés à -20°C.

VI.3 Électrophorèse SDS-PAGE

VI.3.1 Préparation de l'échantillon et paramètres de migration

En fonction de la quantité de protéines désirée (au minimum 2,5 µg et jusqu'à 5 µg), un certain volume d'échantillon est prélevé et mélangé au tampon de charge Laemmli (62 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % (v/v) glycérol, 0,04 % (w/v) bromophénol bleu, 0,1 M DTT, 4 % (w/v) SDS) pour atteindre un volume final de 20 µL.

Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 5 min puis déposé sur un gel SDS-PAGE dont la composition est indiquée dans le **Tableau 12**. La première partie du gel, appelée gel de concentration, possède un faible pourcentage d'acrylamide car il n'a pas d'action séparatrice et doit permettre à toutes les protéines de pénétrer dans le gel. La seconde partie, appelée gel de séparation discrimine les protéines selon leurs masses moléculaires. Le pourcentage

d'acrylamide du gel de séparation peut varier selon la gamme de masse qu'on souhaite étudier. Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus on sépare les protéines de faibles poids moléculaire et inversement.

Les protéines migrent dans une cuve de migration électrophorétique (BioRad) à l'aide d'un tampon de migration (3g/L de Tris-Base, 14 g/L de glycine 1 g/L de SDS). L'échantillon parcourt le gel de concentration pendant environ 20 min sous 10 mA puis une fois les protéines entrées dans le gel de séparation l'intensité est augmentée à 20 mA, jusqu'à la sortie du front de migration.

Tableau 12 Composition d'un gel SDS-PAGE.			
Réactifs	Volume pour 1 gel		
	Gel de concentration 4,5 %	Gel de séparation	
		12,5 %	10 %
Eau ultrapure	1,2 mL	2 mL	2,5 mL
Tris-HCl 1 M pH 8,8	/	1,5 mL	
Tris-HCl 1 M pH 6,8	500 µL	/	
Acrylamide/Bis-acrylamide 30%	300 µL	2,5 mL	2 mL
SDS 20 %	6,25 µL	15 µL	
APS* 20%	6,25 µL	15 µL	
TEMED**	2 µL	5 µL	

*APS : ammonium persulfate

**TEMED : tétraméthyléthylènediamine

À la fin de la migration le gel est coloré au nitrate d'argent 0,1%.

VI.3.2 Coloration des protéines au nitrate d'argent 0,1 %

La coloration au nitrate d'argent s'effectue en plusieurs étapes. La première consiste à fixer les protéines en plongeant le gel pendant au moins 45 minutes dans un bain de fixation (30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) acide acétique et 60% (v/v) eau ultrapure). Le gel est ensuite rincé par deux bains d'EtOH 10% (v/v) de 10 min puis trois bains de 10 min à l'eau ultrapure. Le gel est ensuite sensibilisé avec une solution de thiosulfate de sodium 0,02 % (v/v) pendant 1 min puis coloré avec une solution de nitrate d'argent 0,1 % (m/v) pendant 30 min à l'obscurité. Enfin, la révélation des bandes protéiques se fait par deux bains de 10 min dans une solution de développement (2,4 g de carbonate de sodium, 8 µL de thiosulfate de sodium à 0,2% et 20 µL de formaldéhyde dans un volume final de 2 L). La révélation est arrêtée grâce à une solution d'arrêt à 1 % d'acide acétique (v/v).

Le gel est numérisé grâce au système Image Scanner III (GE Healthcare) et l'image est traitée par le logiciel LabScan version 6.0 (GE Healthcare).

VI.3.3 Digestion des protéines par la méthode « gel-based »

IV.1 Préparation de l'échantillon et paramètres de migration

L'échantillon protéique doit être préparé en fonction de l'analyse par spectrométrie de masse souhaitée. Pour cette analyse quantitative, les protéines sont digérées selon la méthode « gel based ». L'étape de migration sur gel permettra de concentrer les protéines avant la digestion trypsique.

Idéalement, une quantité de 25 µg de protéine est mélangée au tampon Laemmli puis déposée sur un grand gel à 7% d'acrylamide dont la composition est indiquée dans le **Tableau 13**.

Les protéines migrent dans le gel à l'aide du tampon de migration et sous l'action d'un champ électrique réglé à 10 mA pendant 45 min puis 20 mA pendant 1 h et 45 min.

Tableau 13 Composition d'un gel label-free.	
Réactifs	Volume pour 1 gel à 7%
Eau ultrapure	25 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	5 mL
Acrylamide/Bis-acrylamide 30%	9,3 mL
SDS 20 %	200 µL
APS 20%	200 µL
TEMED	40 µL

Le gel est prêt pour la coloration.

VI.3.4 Coloration des protéines au bleu de Coomassie G250

Le gel est coloré par une solution de bleu de Coomassie G250 pendant 30 à 60 sec puis décoloré par une solution de décoloration (50% (v/v) EtOH, 10% (v/v) acide acétique, 40 % (v/v) eau ultrapure). Au fur et à mesure de la décoloration, les bandes protéiques apparaissent. Elles doivent être bien visibles pour pouvoir être correctement découpées.

Les bandes protéiques sont découpées et placées dans un Eppendorf annoté.

VI.3.5 Digestion trypsique et dosage peptidique

Les bandes protéiques sont d'abord lavées à l'eau ultrapure pendant 5 min.

Les bains successifs décrits ci-dessous durent chacun 10 min et se font avec un volume réactionnel de 100 μ L.

La première étape consiste à réduire les ponts disulfures entre les cystéines grâce à un bain de DTT à 5 mM. Afin d'éviter la reformation de ces ponts, les cystéines sont alkylées par un bain d'iodoacétamide à 20 mM. Les bandes protéiques sont ensuite déshydratées par un mélange 50/50 d'ACN et de carbonate d'ammonium 10 mM (pH 8) puis par trois bains d'ACN 100%. Une solution de trypsine (Promega), préparée avec du carbonate d'ammonium 10 mM (pH 8) est ajoutée selon le ratio 1/25 ; soit 1 μ g de trypsine pour 25 μ g de protéines. La digestion s'effectue sur la nuit à une température de 37°C sous agitation. Les peptides sont récupérés dans un tube Eppendorf. Afin de collecter les peptides, la bande est lavée à l'eau ultrapure, puis par un mélange 50/50 d'eau ultrapure et de TFA 0,1% (v/v). Enfin les bandes sont déshydratées par trois bains d'ACN 100%.

Les peptides sont séchés par évaporation grâce au Speedvac (ThermoFisher Scientific) et stockés à sec à -20°C.

N.B : ce protocole de digestion est aussi applicable à un gel SDS-PAGE.

Afin de contrôler la quantité de protéine déposée sur le gel et la qualité de la digestion, les peptides sont dosés grâce au kit Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (ThermoScientific) en suivant le protocole du fournisseur. Avant d'effectuer le dosage, les peptides sont resuspendus dans une solution d'AF (acide formique) 0,1% (v/v) afin d'obtenir une concentration finale de 1 μ g/ μ L.

VI.4 Analyse par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Elite

La solution peptidique (de 1 μ g/ μ L) est diluée au cinquième afin d'injecter 0,2 μ g de peptides soit 1 μ L. Les peptides sont d'abord séparés par nano-chromatographie en phase liquide grâce au système Ultimate 3000 RSLCnano System (ThermoScientific) en utilisant comme colonne d'enrichissement une C18 PepMap100 (75 μ m ID x 2 cm, 3 μ m, 100 Å, Acclaim) et une colonne analytique NTCC (360 μ m ID x 15,3 cm, 5 μ m, 100 Å, NikkyoTechnos, Tokyo, Japan). Les phases mobiles A et B sont composées respectivement de H₂O 100%/AF 0,1% (v/v) et d'ACN 100%/AF 0,1% (v/v). Le gradient d'élution est réalisé à un débit de 300 nL/min selon les conditions suivantes : de 2% à 40% de B de 0 à 106 min, de 40% à 100% de B de 106 à 110 min et 100% de B de 110 à 120 min. Les colonnes sont maintenues à température ambiante.

Le système chromatographique est couplé au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Elite (ThermoScientific). Dans la source nanospray (ThermoScientific), où les peptides sont ionisés en mode positif, la température du capillaire est de 275°C et la tension de 1,8 kV. Les ions peptidiques intacts sont analysés dans l'Orbitrap (R = 60 000) selon la gamme de masse allant

de 400 à 1800 m/z . Suite à cette MS, les 20 ions précurseurs les plus intenses sont sélectionnés pour une analyse MS². L'ion précurseur est fragmenté selon le mode CID avec une énergie de collision normalisée de 35. L'hélium est utilisé pour la fragmentation. Les ions fils sont alors analysés dans la trappe ionique.

À la suite de l'analyse, les données sont enregistrées dans un fichier ". raw". Ces fichiers sont utilisés pour identifier et quantifier les protéines grâce aux logiciels Proteome Discoverer (ThermoScientific, version 1.4) et Progenesis (Nonlinear Dynamics, version 4.0.4441.29989, Newcastle, UK).

VI.5 Analyse par le spectromètre de masse Q-Exactive Plus

La solution peptidique (de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) est diluée au cinquième afin d'injecter 0,2 μg de peptides soit 1 μL . Les peptides sont d'abord séparés par nano-chromatographie en phase liquide grâce au système Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific) avec comme colonne d'enrichissement une C18 PepMap100 (300 μm ID x 5 mm, 5 μm , 100 Å, Thermo Scientific) et une colonne de phase inverse C18 (NTCC-360 ; 100 μm ID x 153 mm, 5 μm , NikkyoTechnos, Tokyo, Japan). La phase mobile (phase A) est composée d'eau et 0.1% d'acide formique et la phase B est composée de 80% d'ACN, 20% d'eau et 0.1% d'acide formique. Le gradient de séparation est réalisé à un débit de 300 nL/min selon les conditions suivantes : 2 à 55% de B de 0 à 106 min, 55 à 100% de B de 106 à 110 min et 100% de B de 110 à 125 min.

Le système chromatographique est couplé au spectromètre de masse Q-Exactive Plus (ThermoScientific). Dans la source nanoESI, où les peptides sont ionisés en mode positif, la température du capillaire est de 275°C et la tension de 1,8 kV. L'analyse est réalisée selon une étude MS². Les ions peptidiques intacts sont analysés dans l'Orbitrap (R = 70 000) selon la gamme de masses allant de 400 à 1800 m/z . Suite à cette MS, les 10 ions précurseurs les plus intenses sont sélectionnés pour une analyse MS². L'ion précurseur est fragmenté dans la cellule de collision selon le mode HCD avec une énergie de collision normalisée de 28. L'exclusion dynamique est réglée à 20 sec. Les ions fils sont analysés dans l'Orbitrap (R=17 500). Les ions possédant une seule charge ($z=1$) ne sont pas sélectionnés pour une analyse MS².

À la suite de l'analyse, les données sont enregistrées dans un fichier ". raw". Ces fichiers sont utilisés pour identifier et quantifier les protéines grâce aux logiciels Proteome Discoverer (ThermoScientific, version 1.4) et Progenesis (Nonlinear Dynamics, version 4.0.4441.29989, Newcastle, UK).

VI.6 Traitement des données spectrales pour identification et/ou quantification

VI.6.1 Identification des protéines par Proteome Discoverer

Les fichiers « .raw » sont importés dans le logiciel Proteome Discoverer 1.4 (version 1.4.1.14, ThermoScientific). Pour l'identification, les rapports m/z expérimentaux sont comparés aux rapports m/z théoriques présents dans la base de données NCBI (National center for biotechnology information) (*Pseudomonas aeruginosa*, Taxonomy ID: 287) par le logiciel Mascot (Matrix Science). La recherche est effectuée selon les paramètres suivants : 2 sites de clivage tryptique manqués autorisés et présence de modifications variables : carbamidométhylation sur les cystéines et oxydation des méthionines. Les tolérances de masse pour les ions précurseurs et fragmentés sont définies à 5 ppm et 0,02 Da, respectivement lorsque l'analyse est effectuée par le Q-Exactive Plus. Si l'analyse est effectuée par le LTQ-Orbitrap Elite, la tolérance de masse pour les ions fragmentés est définie à 0,35 Da. Le taux de faux positif (FRD pour false discovery rate) autorisé est de 1%. Les protéines identifiées avec un seul peptide sont exclues du fichier d'identification.

Les fichiers sont exportés sous format Excel pour être traités ultérieurement.

VI.6.2 Quantification relative des protéines par Progenesis LC-MS/MS

Les fichiers « .raw » sont importés dans le logiciel Progenesis LC-MS/MS (Nonlinear Dynamics, version 4.1, Newcastle, UK). Pour chaque échantillon, une carte d'ions peptidiques bidimensionnelle (rapport m/z en fonction du temps de rétention) est générée. Les différentes cartes sont ensuite alignées par rapport à une carte de référence issue des échantillons expérimentaux analysés. Après alignement et normalisation, l'analyse statistique est réalisée par analyse des variances selon l'ANOVA une voie.

Les peptides présentant une p-value (p) inférieure à 0,05 sont retenus pour la quantification. Les spectres MS² des peptides retenus sont exportés sur Mascot (Matrix Science, version 2.2.04) pour l'identification contre la base de données de NCBI (*Pseudomonas aeruginosa*, Taxonomy ID : 287). La recherche est effectuée selon les paramètres suivants : 2 sites de clivage tryptique manqué autorisé et présence de modifications variables : carbamidométhylation sur les cystéines et oxydation des méthionines. Les tolérances de masse pour les ions précurseurs et les ions fragments sont réglées à 5 ppm et 0,02 Da, respectivement. Le FDR est calculé par Mascot selon une approche « decoy-fusion ». Les peptides identifiés avec un score ($-10\log P$) de 20 et plus sont conservés. Les résultats de Mascot sont importés dans Progenesis. Pour chaque condition, l'abondance totale d'une protéine est calculée en additionnant les abondances des peptides correspondants. Les

protéines identifiées avec moins de 2 peptides sont exclues de l'analyse. Seules les protéines qui possèdent une différence d'abondance moyenne normalisée (fold change) au minimum de 1,5 entre les deux conditions comparées sont retenues.

Les fichiers sont exportés sous format Excel pour être traités ultérieurement à l'aide d'outils bio-informatiques.

VII. Purification par la méthode IMAC en vue d'une étude structurale

Les étapes de culture, d'induction et d'extraction ont été optimisées au préalable. Les détails de cette optimisation sont disponibles dans la partie Projet de recherche – Partie 3 – Chapitre 1 – Section II.1.

La purification est réalisée à l'aide d'une résine composée de billes d'agarose greffées avec du Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) (Quiagen). Le principe de la chromatographie IMAC est résumé sur la **Figure 95**. Cinq cents μL de résine sont lavés deux fois à l'eau ultrapure puis une fois dans le tampon utilisé pour la lyse (ici du Tris HCl 20 mM [pH 7,4] NaCl 150 mM). Dans un tube à hémolyse, 4 mL d'extrait protéique sont ajoutés à la résine et le mélange est placé sous agitation durant une nuit et à 4°C.

Ce mélange est déposé sur une colonne chromatographique en polypropylène (Bio-Rad). Cette colonne contient un support en polyéthylène poreux retenant les fines particules de diamètre supérieur à 30 μm (BioRad). La résine est retenue sur ce support tandis que la solution non retenue, est récupérée. Ce premier aliquot est nommé « non-retenu ». Les billes sont ensuite lavées successivement avec 10 mL d'une solution de lavage contenant du Tris HCl 20 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM et des concentrations croissantes d'imidazole (20, 50, 80 et 100 mM). À chaque lavage, un aliquot est récupéré. L'étape d'élution, quant à elle, est réalisée avec 4 mL de solution contenant du Tris HCl 20 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM et 500 mM d'imidazole. Les fractions d'élution sont récupérées tous les 500 μl soit 8 fractions au total.

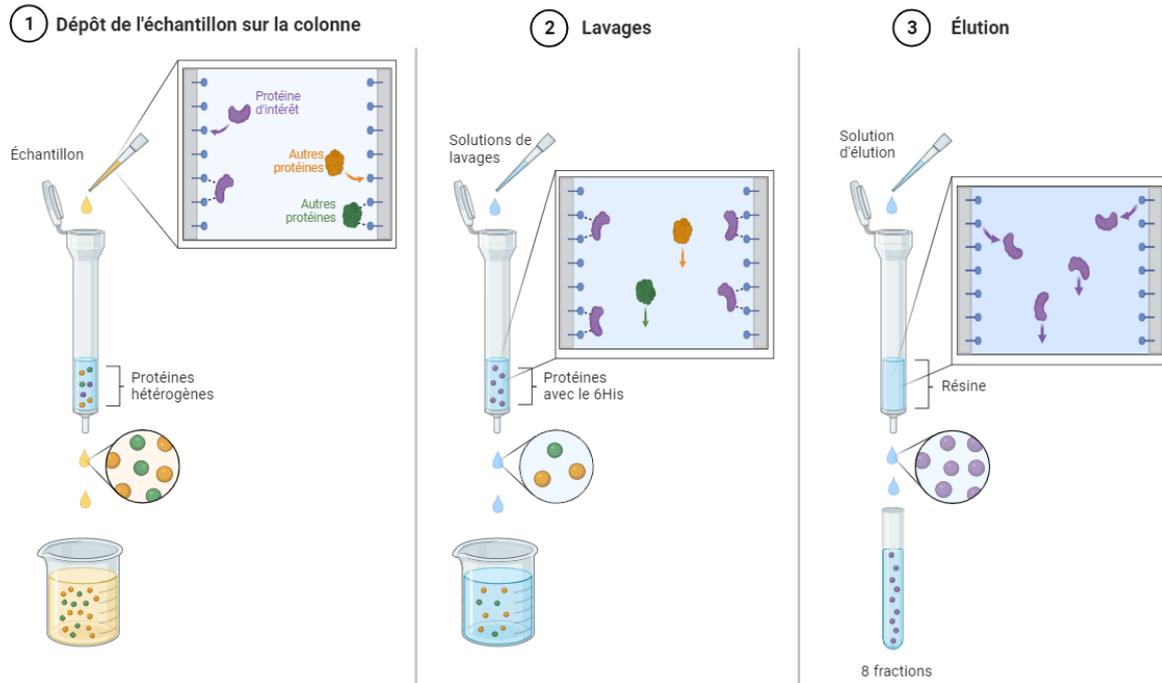


Figure 95 | Principe de la purification basée sur la méthode IMAC.

VIII. Les logiciels bio-informatiques utilisés pour l'étude du système BAC

Ces logiciels analysent les propriétés intrinsèques de la séquence pour prédire par exemple les interactions avec d'autres protéines, la localisation, la fonction et la structure.

La localisation cellulaire a été effectuée grâce aux programmes PSORT, Phobius et DeepTMHMM (Chen et al., 2003; Käll et al., 2007; Nakai et al., 1999).

La banque d'annotation fonctionnelle Interpro a été utilisée pour prédire la recherche de domaine (Paysan-Lafosse et al., 2023). Cette base est aussi alimentée par d'autres bases de données de prédiction fonctionnelle comme Pfam (Punta et al., 2012), CDD (consensus domain dictionary) (Schaeffer et al., 2011), Prosite (Sigrist et al., 2013), Smart (simple modular architecture research tool) (Letunic et al., 2012), ou encore PANTHER (Thomas et al., 2022). Interpro intègre aussi les logiciels Phobius et DeepTMHMM, cités au-dessus.

La base de données Interpro a été consultée de plusieurs manières, à partir : *i*) de mot-clé, *ii*) de la séquence protéique et *iii*) des features. En plus d'indiquer le domaine, Interpro (et les autres logiciels intégrés) met à disposition d'autres informations complémentaires comme la distribution phylogénétique du domaine, la conformation structurale connues de protéines contenant ce domaine ou encore des liens vers d'autres bases de données.

Le « modeling » des protéines a été effectuée avec le logiciel SWISS-MODEL (A. Waterhouse et al., 2018). Le modeling consiste à modéliser la structure tertiaire adoptée par la protéine. Le modeling peut se faire par homologie structurale à partir d'un alignement multiple (**Figure**

96). Ces homologues structuraux servent de « template » pour résoudre la structure tertiaire de la protéine d'intérêt. Ceci implique que les templates utilisés ont tous leur structure 3D résolue et disponible dans la base de données PDB. Plusieurs scores, spécifiques au logiciel considéré, sont attribués au modèle, dont le score qualité. Plus ce score est haut plus la probabilité que la protéine d'intérêt et le « template » soient homologues est élevée.

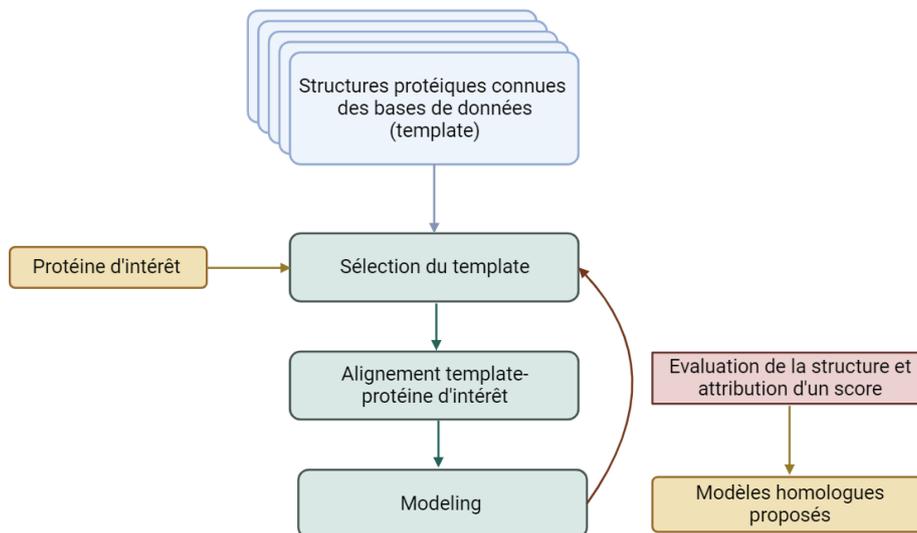


Figure 96 | Stratégie employée par les logiciels de modeling basée sur l'homologie structurale.

Si aucun homologue structural n'a été trouvé c'est le modèle prédit par le logiciel AlphaFold qui a été utilisé (David et al., 2022; Ruff & Pappu, 2021). Ce logiciel intègre une intelligence artificielle qui prédit le modèle à partir de la séquence en acides aminés. Là encore des scores sont attribués au modèle prédit.

Annexes

Annexe 1 : Table S3. Proteins identified in biofilm formed by the WT and *bacA* mutant

Accession	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	q Value	Max fold change	Power	Highest mean condition	Lowest mean condition	Gene	Description
YP_788196.1 gi 116053761	7	316,57	1,08E-02	6,67E-02	1,92	0,91	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_00490	hemolysin activation/secretion protein
YP_788211.1 gi 116053776	2	92,21	3,22E-03	4,73E-02	1,66	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_00670	hypothetical protein
YP_788222.1 gi 116053787	2	94,22	3,86E-02	1,12E-01	1,53	0,63	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_00780	hypothetical protein
YP_788243.1 gi 116053806	2	98,02	1,09E-04	2,39E-02	2,30	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_01040	secretion protein
YP_788298.1 gi 116053861	18	920,32	1,64E-02	7,76E-02	1,66	0,84	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_01730	hypothetical protein
YP_788320.1 gi 116053883	3	246,57	2,92E-02	9,96E-02	1,84	0,70	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_02020	outer membrane porin
YP_788351.1 gi 116053913	4	219,27	4,16E-02	1,16E-01	1,53	0,61	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_02450	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha part 1
YP_788401.1 gi 116053963	3	245,77	1,13E-02	6,67E-02	1,70	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_03090	hypothetical protein
YP_788438.1 gi 116053996	7	517,89	1,18E-02	6,76E-02	1,52	0,90	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_03490	hypothetical protein
YP_788469.1 gi 116054026	11	583,77	6,44E-04	2,67E-02	1,88	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_03920	polyamine transport protein

YP_788470.1 gi 116054027	9	334,25	2,16E-03	4,01E-02	1,71	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_03930	polyamine transport protein
YP_788471.1 gi 116054028	6	417,55	2,74E-02	9,79E-02	1,75	0,72	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_03940	polyamine transport protein PotG
YP_788485.1 gi 116054042	5	275,95	1,19E-02	6,82E-02	3,12	0,90	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_04100	hypothetical protein
YP_788535.1 gi 116054092	5	282,61	7,28E-03	5,85E-02	1,58	0,96	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_04760	phosphopantetheine adenylyltransferase
YP_788554.1 gi 116054111	3	227,02	1,59E-02	7,69E-02	1,61	0,85	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_04980	thiazole synthase
YP_788561.1 gi 116054118	4	182,68	4,37E-02	1,17E-01	1,63	0,59	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_05060	hypothetical protein
YP_788632.1 gi 116054188	33	1778,55	4,10E-02	1,16E-01	1,66	0,61	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_06000	ClpA/B protease ATP binding subunit
YP_788646.1 gi 116054202	4	118,4	2,28E-02	9,26E-02	1,67	0,77	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_06190	glutathione S-transferase
YP_788795.1 gi 116054350	2	110,52	4,20E-02	1,16E-01	1,53	0,61	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_08070	phage tail sheath protein
YP_788822.1 gi 116054377	4	139,75	2,97E-02	1,00E-01	1,80	0,70	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_08370	cAMP-regulatory protein
YP_788848.1 gi 116052306	4	259,48	1,30E-02	6,92E-02	2,03	0,88	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_08750	50S ribosomal protein L7/L12
YP_788887.1 gi 116052269	4	299,98	1,54E-02	7,52E-02	1,96	0,85	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_09200	single-stranded DNA-binding protein
YP_788908.1 gi 116052248	7	398,45	3,67E-02	1,09E-01	1,56	0,64	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_09470	phenazine biosynthesis protein

YP_788915.1 gij116052241	6	386,73	4,82E-03	4,75E-02	1,54	0,98	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_09550	hypothetical protein
YP_788917.1 gij116052239	2	69,66	1,62E-02	7,70E-02	1,50	0,84	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_09580	hypothetical protein
YP_789017.1 gij116052139	2	58,71	2,43E-02	9,39E-02	14,08	0,75	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_10850	dehydrogenase
YP_789042.1 gij116052114	46	2961,14	4,04E-02	1,14E-01	1,70	0,62	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_11140	nonribosomal peptide synthetase
YP_789088.1 gij116052068	7	391,73	1,79E-03	3,92E-02	2,13	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_11690	inorganic pyrophosphatase
YP_789129.1 gij116052028	2	104,71	1,66E-02	7,84E-02	1,86	0,84	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_12200	DNA polymerase III subunit delta
YP_789130.1 gij116052027	11	706,09	4,44E-03	4,75E-02	1,65	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_12210	hypothetical protein
YP_789137.1 gij116052020	3	159,17	2,68E-04	2,46E-02	2,20	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_12330	hypothetical protein
YP_789195.1 gij116051962	25	2160,84	1,58E-03	3,76E-02	1,62	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_13140	hypothetical protein
YP_789198.1 gij116051959	3	209,23	3,77E-03	4,75E-02	2,16	0,99	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_13190	hypothetical protein
YP_789268.1 gij116051889	3	174,28	5,52E-04	2,67E-02	1,53	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14100	amino acid-binding protein
YP_789271.1 gij116051886	3	138,24	2,46E-02	9,43E-02	1,55	0,75	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14140	hypothetical protein
YP_789291.1 gij116051866	11	808,72	1,00E-02	6,61E-02	1,78	0,92	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14390	ABC-type transport protein, periplasmic c
YP_789313.1 gij116051844	4	280,15	2,33E-03	4,16E-02	2,20	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14660	hypothetical protein

YP_789319.1 gij11 6051838	2	67,27	1,70E-02	7,88E-02	2,45	0,83	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14740	scaffold protein
YP_789332.1 gij11 6051825	6	319,6	2,66E-02	9,67E-02	1,76	0,73	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14910	hypothetical protein
YP_789335.1 gij11 6051822	3	81,84	2,82E-03	4,37E-02	1,58	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_14960	hypothetical protein
YP_789347.1 gij11 6051811	4	141,36	3,41E-02	1,06E-01	1,67	0,66	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_15120	hypothetical protein
YP_789365.1 gij11 6051793	3	137,65	2,84E-02	9,88E-02	1,84	0,71	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_15350	integrase
YP_789387.1 gij11 6051774	11	545,85	8,88E-04	2,90E-02	5,16	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_15590	hypothetical protein
YP_789418.1 gij11 6051743	3	201,08	2,12E-02	9,05E-02	1,65	0,78	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_15970	30S ribosomal protein S16
YP_789433.1 gij11 6051728	15	1272,45	3,64E-04	2,46E-02	7,24	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_16150	hypothetical protein
YP_789434.1 gij11 6051727	3	193,64	4,24E-03	4,75E-02	7,94	0,99	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_16160	hypothetical protein
YP_789435.1 gij11 6051726	39	2588,29	3,05E-04	2,46E-02	13,50	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_16180	hypothetical protein
YP_789436.1 gij11 6051725	13	568,41	2,20E-04	2,46E-02	8,92	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_16190	hypothetical protein
YP_789437.1 gij11 6051724	7	382,28	7,90E-06	6,98E-03	6,13	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_16200	hypothetical protein
YP_789440.1 gij11 6051721	26	2431,64	4,67E-04	2,65E-02	2,65	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_16250	elastase LasB
YP_789448.1 gij11 6051713	5	246,46	4,28E-03	4,75E-02	1,66	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_16330	hypothetical protein
YP_789492.1 gij11 6051669	2	66,96	1,80E-02	8,08E-02	1,81	0,82	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_16870	ABC transporter ATP-binding protein
YP_789510.1 gij11 6051651	9	343,66	2,78E-03	4,37E-02	1,92	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_17080	uridylyate kinase

YP_789511.1 gi 116051650	11	709,64	3,91E-02	1,13E-01	1,77	0,63	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_17100	ribosome recycling factor
YP_789517.1 gi 116051644	6	373,68	5,23E-05	1,92E-02	1,95	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_17170	hypothetical protein
YP_789535.1 gi 116051626	6	251,48	7,17E-03	5,85E-02	1,78	0,96	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_17400	alcohol dehydrogenase
YP_789596.1 gi 116051566	2	116,7	9,88E-03	6,57E-02	2,00	0,92	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_18140	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
YP_789625.1 gi 116051539	2	49,72	7,66E-03	5,89E-02	1156,62	0,95	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_18580	GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD
YP_789636.1 gi 116051528	16	1051,49	1,15E-02	6,69E-02	1,99	0,90	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_18690	peroxidase
YP_789641.1 gi 116051523	2	77,91	6,83E-03	5,76E-02	1,61	0,96	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_18750	lactoylglutathione lyase
YP_789686.1 gi 116051481	9	669,71	2,00E-03	3,96E-02	2,26	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19350	hypothetical protein
YP_789688.1 gi 116051479	16	920,91	4,05E-03	4,75E-02	1,69	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19370	asparagine synthetase
YP_789720.1 gi 116051447	2	102,06	3,55E-03	4,75E-02	1,50	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19730	oxidoreductase
YP_789730.1 gi 116051437	10	621,08	1,05E-02	6,67E-02	1,72	0,92	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19900	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
YP_789731.1 gi 116051436	5	248,27	4,38E-03	4,75E-02	2,10	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19910	pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain
YP_789732.1 gi 116051435	3	207,89	2,73E-02	9,79E-02	1,72	0,72	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_19920	branched-chain alpha-keto acid

											dehydrogenase subunit E2
YP_789786.1 gij 116051381	15	1048,7	4,34E-03	4,75E-02	1,66	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_20560	acylamide amidohydrolase	
YP_789820.1 gij 116051347	3	130,7	4,30E-02	1,16E-01	1,69	0,60	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_20960	isomerase	
YP_789843.1 gij 116051325	8	631,43	3,31E-02	1,06E-01	1,71	0,67	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_21220	hypothetical protein	
YP_789851.1 gij 116051317	2	118,92	4,76E-02	1,20E-01	1,87	0,57	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_21310	hypothetical protein	
YP_789905.1 gij 116051263	5	208,01	3,33E-02	1,06E-01	1,66	0,67	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_21960	hypothetical protein	
YP_789985.1 gij 116051184	9	582,78	2,18E-03	4,01E-02	1,65	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_22890	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
YP_790093.1 gij 116051077	4	245,26	2,24E-04	2,46E-02	1,72	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_24310	BNR/Asp-box repeat-containing protein	
YP_790108.1 gij 116051063	4	152,75	7,93E-04	2,86E-02	3,46	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_24490	hypothetical protein	
YP_790155.1 gij 116051018	3	164,99	4,12E-02	1,16E-01	1,61	0,61	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_25040	hypothetical protein	
YP_790159.1 gij 116051014	14	788,45	2,45E-03	4,16E-02	2,07	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_25090	3-ketoacyl-CoA thiolase	
YP_790182.1 gij 116050993	3	99,05	5,80E-03	5,27E-02	1,71	0,97	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_25400	phosphodiesterase	
YP_790207.1 gij 116050968	3	202,25	2,17E-02	9,13E-02	1,69	0,78	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_25670	acyl carrier protein	
YP_790222.1 gij 116050953	14	1251,44	1,59E-02	7,69E-02	1,66	0,85	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_25880	electron transfer flavoprotein subunit alpha	

YP_790272.1 gi 116050905	4	150,38	2,03E-03	3,96E-02	2,16	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_26540	hypothetical protein
YP_790274.1 gi 116050903	4	142,04	1,67E-02	7,85E-02	1,63	0,84	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_26560	outer membrane protein
YP_790285.1 gi 116050892	5	116,44	1,51E-03	3,69E-02	2,40	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_26700	acyl-CoA dehydrogenase
YP_790320.1 gi 116050857	2	52,56	2,36E-02	9,30E-02	1,62	0,76	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_27180	hypothetical protein
YP_790333.1 gi 116050844	12	781,05	2,32E-02	9,26E-02	1,89	0,76	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_27370	ATP-dependent RNA helicase
YP_790352.1 gi 116050825	2	86,21	1,70E-02	7,88E-02	1,86	0,83	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_27580	glutathione S-transferase
YP_790428.1 gi 116050751	4	231,57	2,50E-02	9,43E-02	1,82	0,74	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_28450	ecotin
YP_790450.1 gi 116050729	12	844,29	2,29E-02	9,26E-02	1,70	0,77	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_28710	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta
YP_790550.1 gi 116050631	6	276,75	1,24E-02	6,84E-02	1,63	0,89	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_29920	NADH dehydrogenase subunit I
YP_790613.1 gi 116050568	3	193,1	1,84E-02	8,13E-02	1,87	0,82	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_30710	osmoprotectant transporter activator protein
YP_790683.1 gi 116050498	9	550,87	1,44E-02	7,30E-02	1,67	0,87	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_31510	short-chain dehydrogenase
YP_790693.1 gi 116050488	4	232,53	2,48E-02	9,43E-02	1,55	0,75	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_31660	hypothetical protein
YP_790705.1 gi 116050476	9	1097,14	3,45E-02	1,06E-01	1,68	0,66	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_31810	thiol peroxidase
YP_790707.1 gi 116050474	6	311,64	8,05E-04	2,86E-02	1,81	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_31840	hypothetical protein

YP_790830.1 gij 116050353	5	228,18	2,86E-03	4,37E-02	2,63	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_33500	diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase
YP_790846.1 gij 116050337	3	176,71	3,45E-03	4,75E-02	2,45	0,99	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_33700	pyoverdine synthetase F
YP_790848.1 gij 116050335	2	115,92	6,90E-03	5,79E-02	1,55	0,96	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_33720	protein PvdN
YP_790850.1 gij 116050333	7	270,24	9,89E-03	6,57E-02	1,97	0,92	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_33740	protein PvdP
YP_790856.1 gij 116050327	10	621,94	2,06E-03	3,96E-02	1,97	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_33810	L-ornithine N5-oxygenase
YP_790909.1 gij 116050274	12	857,74	2,20E-02	9,21E-02	1,63	0,78	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_34490	hypothetical protein
YP_790938.1 gij 116050245	2	40,65	4,23E-02	1,16E-01	1,55	0,60	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_34850	tRNA synthase
YP_790986.1 gij 116050197	30	2570,04	1,24E-03	3,32E-02	1,55	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_35490	dihydrolipoamide dehydrogenase
YP_790988.1 gij 116050195	6	328,74	5,91E-03	5,30E-02	2,55	0,97	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_35520	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta
YP_791084.1 gij 116050102	2	69,99	2,32E-02	9,26E-02	6,69	0,76	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_36650	hypothetical protein
YP_791097.1 gij 116050089	17	826,47	7,70E-03	5,89E-02	2,30	0,95	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_36810	hydroperoxidase II
YP_791141.1 gij 116050045	2	66,48	1,46E-04	2,46E-02	4,42	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_37370	esterase
YP_791240.1 gij 116049950	4	248,5	1,14E-02	6,67E-02	1,61	0,90	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_38660	CoA transferase, subunit A
YP_791294.1 gij 116049897	3	162,45	4,82E-03	4,75E-02	2,41	0,98	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_39350	ribose ABC transporter

											substrate-binding protein
YP_791297.1 gi 116049894	2	122,93	1,85E-02	8,13E-02	2,00	0,81	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_39410		hypothetical protein
YP_791325.1 gi 116049866	3	144,54	2,50E-02	9,43E-02	1,62	0,74	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_39780		hypothetical protein
YP_791368.1 gi 116049825	3	258,04	1,75E-02	8,01E-02	1,60	0,83	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_40290		LasA protease
YP_791377.1 gi 116049816	2	44,26	7,91E-03	5,95E-02	3,78	0,95	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_40390		molybdate-binding periplasmic protein precursor modA
YP_791380.1 gi 116049813	6	247,33	2,16E-02	9,13E-02	1,66	0,78	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_40430		hypothetical protein
YP_791394.1 gi 116049799	4	160,87	8,30E-03	6,00E-02	2,33	0,94	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_40630		hypothetical protein
YP_791437.1 gi 116049756	2	92,39	2,63E-02	9,65E-02	1,56	0,73	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_41170		NADH-dependent enoyl-ACP reductase
YP_791452.1 gi 116049741	7	372,39	4,36E-02	1,17E-01	1,79	0,59	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_41390		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
YP_791473.1 gi 116049722	5	265,04	7,80E-04	2,86E-02	2,03	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_41640		ribonuclease activity regulator protein RraA
YP_791476.1 gi 116049719	5	181,12	4,60E-03	4,75E-02	1,61	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_41680		hypothetical protein
YP_791497.1 gi 116049698	7	835,72	3,88E-03	4,75E-02	1,93	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_41950		enoyl-CoA hydratase

YP_791508.1 gi 116049687	13	550,16	7,10E-03	5,85E-02	1,58	0,96	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_42080	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
YP_791509.1 gi 116049686	3	218,46	1,20E-03	3,32E-02	2,30	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_42090	acetyl-CoA acetyltransferase
YP_791572.1 gi 116049623	4	152,59	9,89E-04	3,01E-02	1,57	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_42850	GTP cyclohydrolase I
YP_791607.1 gi 116049588	2	100,63	1,61E-02	7,70E-02	2,48	0,84	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_43250	hypothetical protein
YP_791634.1 gi 116049562	2	70,94	3,79E-02	1,11E-01	1,79	0,63	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_43610	AMP-binding protein
YP_791654.1 gi 116049542	4	224,76	1,82E-02	8,12E-02	1,69	0,82	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_43840	hypothetical protein
YP_791662.1 gi 116049534	17	1098,55	1,12E-02	6,67E-02	1,55	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_43940	succinyl-CoA synthetase subunit alpha
YP_791666.1 gi 116049530	19	888,45	4,98E-02	1,21E-01	1,71	0,56	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_44010	2-oxoglutarate dehydrogenase E1
YP_791671.1 gi 116049525	23	1485,7	3,46E-02	1,06E-01	1,53	0,66	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_44070	type II citrate synthase
YP_791672.1 gi 116049524	3	227,45	4,49E-02	1,18E-01	1,94	0,59	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_44080	hypothetical protein
YP_791691.1 gi 116049505	30	1691,75	4,00E-02	1,14E-01	1,72	0,62	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_44290	aconitate hydratase
YP_791760.1 gi 116049437	8	394,96	2,07E-02	8,87E-02	1,82	0,79	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_45110	sulfate-binding protein of ABC transporter
YP_791903.1 gi 116049294 ;YP_793551.1 gi 116053228	20	1299,24	1,81E-02	8,10E-02	1,78	0,82	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_46910	ABC transporter substrate-binding protein

YP_791921.1 gij116049276	6	298,06	4,47E-02	1,18E-01	1,72	0,59	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_47120	hypothetical protein
YP_791958.1 gij116049239	5	219,31	3,60E-02	1,08E-01	1,99	0,65	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_47550	glutathione peroxidase
YP_792046.1 gij116049152	2	110,91	3,88E-03	4,75E-02	2,99	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_48740	hypothetical protein
YP_792087.1 gij116049111	12	710,81	2,79E-03	4,37E-02	1,74	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_49180	two-component response regulator PhoP
YP_792100.1 gij116049098	4	137,24	8,77E-03	6,10E-02	2,20	0,94	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_49330	hypothetical protein
YP_792131.1 gij116049067	4	125,06	6,34E-04	2,67E-02	2,53	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_49710	chaperone protein HchA
YP_792195.1 gij116049003	18	1288,96	2,77E-04	2,46E-02	2,54	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_50520	branched-chain amino acid transport protein BraC
YP_792263.1 gij116048936	7	362,65	3,43E-02	1,06E-01	2,13	0,66	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_51290	bacterioferritin comigratory protein
YP_792275.1 gij116048924	2	63,8	3,58E-02	1,08E-01	1,79	0,65	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_51430	PqsA
YP_792315.1 gij116048884	5	192,11	4,30E-03	4,75E-02	1,90	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_51860	hypothetical protein
YP_792332.1 gij116048867	9	406,95	3,30E-03	4,75E-02	1,82	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_52060	hypothetical protein
YP_792373.1 gij116048827	6	299,34	3,88E-02	1,12E-01	1,73	0,63	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_52600	alanyl-tRNA synthetase
YP_792378.1 gij116048822	6	311,53	1,37E-02	7,10E-02	1,58	0,87	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_52670	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase
YP_792409.1 gij116048791	6	353,11	4,11E-03	4,75E-02	1,62	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53040	lysozyme inhibitor

YP_792421.1 gi 116048779	8	532,65	1,07E-02	6,67E-02	1,80	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53200	hypothetical protein
YP_792425.1 gi 116048775	16	1535,71	2,89E-02	9,95E-02	1,58	0,71	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53250	chitin-binding protein CbpD
YP_792439.1 gi 116048761	3	197,01	2,98E-02	1,00E-01	1,51	0,70	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53420	glutathione peroxidase
YP_792445.1 gi 116048755	8	595,46	3,86E-02	1,12E-01	1,78	0,63	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53500	hypothetical protein
YP_792486.1 gi 116048714	11	753,19	4,86E-03	4,75E-02	1,64	0,98	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_53940	2-methylisocitrate lyase
YP_792520.1 gi 116048680	10	564,83	1,71E-02	7,88E-02	1,55	0,83	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_54410	negative regulator for alginate biosynthesis MucB
YP_792540.1 gi 116048660	16	853,84	7,89E-03	5,95E-02	1,68	0,95	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_54640	enoyl-CoA hydratase
YP_792690.1 gi 116052379	4	223,05	1,11E-02	6,67E-02	2,68	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_56510	hypothetical protein
YP_792711.1 gi 116052400	6	378,17	2,37E-02	9,30E-02	2,21	0,76	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_56780	superoxide dismutase
YP_792735.1 gi 116052424	8	346,99	1,32E-02	6,92E-02	1,64	0,88	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_57050	3-ketoacyl-ACP reductase
YP_792741.1 gi 116052430	9	437,35	4,84E-02	1,20E-01	1,60	0,57	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_57130	nucleotide-binding protein
YP_792771.1 gi 116052458	6	510,93	4,22E-03	4,75E-02	1,99	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_57500	phosphoheptose isomerase
YP_792777.1 gi 116052464	7	376,51	1,80E-02	8,08E-02	1,60	0,82	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_57570	cytochrome c reductase, iron-sulfur subun
YP_792785.1 gi 116052472	3	123,84	5,80E-03	5,27E-02	1,90	0,97	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_57680	hypothetical protein

YP_792798.1 gij 11 6052485	8	354,86	2,84E-02	9,88E-02	1,91	0,71	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_57840	hypothetical protein
YP_792813.1 gij 11 6052500	5	351,5	1,60E-02	7,70E-02	1,54	0,84	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_58000	superoxide dismutase
YP_792820.1 gij 11 6052507	3	162,2	1,89E-03	3,93E-02	1,59	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_58080	hypothetical protein
YP_792840.1 gij 11 6052527	13	1118,97	2,42E-03	4,16E-02	2,42	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_58330	hypothetical protein
YP_792841.1 gij 11 6052528	5	313,51	1,39E-03	3,63E-02	1,95	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_58350	dipeptide ABC transporter substrate- binding protein DppA1
YP_792859.1 gij 11 6052544	8	393,85	2,84E-02	9,88E-02	1,62	0,71	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_58570	outer membrane ferric siderophore receptor
YP_792971.1 gij 11 6052656	12	1410,03	3,16E-02	1,03E-01	1,70	0,68	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_59840	hypothetical protein
YP_793035.1 gij 11 6052718	4	213,33	3,68E-03	4,75E-02	2,45	0,99	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_60550	ATP-dependent protease
YP_793049.1 gij 11 6052732	4	231,86	1,22E-03	3,32E-02	2,63	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_60750	protein activator
YP_793073.1 gij 11 6052756	2	176,71	7,67E-03	5,89E-02	7,50	0,95	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_61050	large- conductance mechanosensi- tive channel
YP_793085.1 gij 11 6052768	6	344,08	4,31E-02	1,16E-01	1,74	0,60	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_61200	hypothetical protein
YP_793091.1 gij 11 6052774	4	101,9	6,28E-03	5,40E-02	1,98	0,97	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_61280	epimerase

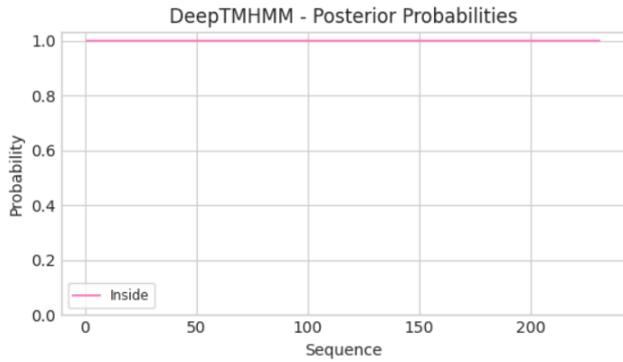
YP_793108.1 gi 116052791	4	202,97	2,99E-02	1,00E-01	1,50	0,70	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_61470	uracil phosphoribosyl transferase
YP_793171.1 gi 116052854	7	401,68	1,27E-02	6,84E-02	1,81	0,89	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_62300	hypothetical protein
YP_793186.1 gi 116052869	10	420,18	1,26E-02	6,84E-02	2,01	0,89	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_62490	suppressor protein DksA
YP_793197.1 gi 116052880	11	527,17	4,42E-03	4,75E-02	1,77	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_62630	acetyl-CoA synthetase
YP_793228.1 gi 116052911	8	492,73	4,72E-03	4,75E-02	2,05	0,98	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_63020	ferric uptake regulation protein
YP_793257.1 gi 116052940	6	271,67	4,60E-02	1,19E-01	1,57	0,58	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_63340	lipoprotein
YP_793381.1 gi 116053062	2	118,47	1,13E-02	6,67E-02	2,22	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_64900	ABC transporter substrate-binding protein
YP_793390.1 gi 116053071	8	265,95	4,21E-03	4,75E-02	3,05	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_65000	azurin
YP_793469.1 gi 116053148	2	72,41	4,55E-02	1,19E-01	1,82	0,58	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_66110	glycosyl transferase family protein
YP_793487.1 gi 116053166	4	196,3	1,09E-02	6,67E-02	1,78	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_66330	peptide methionine sulfoxide reductase
YP_793503.1 gi 116053182	5	362,34	2,30E-02	9,26E-02	1,53	0,76	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_66550	uroporphyrinogen decarboxylase
YP_793532.1 gi 116053210	11	529,85	2,04E-02	8,81E-02	1,55	0,79	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_66900	ubiquinone/menaquinone biosynthesis

										methyltransferase
YP_793576.1 gi 116053253	9	571,74	5,25E-03	4,97E-02	1,60	0,98	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_67440	N-formimino-L-glutamate deiminase
YP_793614.1 gi 116053291	4	165,69	1,88E-03	3,93E-02	2,04	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_67930	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
YP_793624.1 gi 116053300	6	247,96	6,08E-03	5,36E-02	2,36	0,97	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_68070	periplasmic binding protein
YP_793638.1 gi 116053314 ;YP_792392.1 gi 116048808	4	133,1	4,54E-03	4,75E-02	1,86	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_68260	c4-dicarboxylate-binding protein
YP_793649.1 gi 116053325	15	1359,81	3,39E-04	2,46E-02	2,30	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_68400	LysM domain/BON superfamily protein
YP_793673.1 gi 116053349	2	97,18	4,73E-02	1,20E-01	1,82	0,57	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_68710	hypothetical protein
YP_793685.1 gi 116053361	3	151,16	2,90E-02	9,95E-02	1,73	0,71	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_68850	glycine dehydrogenase
YP_793692.1 gi 116053368	5	271,5	1,10E-02	6,67E-02	1,57	0,91	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_68940	hypothetical protein
YP_793712.1 gi 116053387	5	242,71	2,32E-02	9,26E-02	1,51	0,76	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_69200	thioredoxin
YP_793717.1 gi 116053392	6	483,98	4,90E-03	4,75E-02	2,00	0,98	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_69260	isoprenoid biosynthesis protein with amidotransferase-like domain
YP_793733.1 gi 116053408	4	195,1	3,39E-03	4,75E-02	1,53	0,99	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_69450	porphobilinogen deaminase
YP_793870.1 gi 116053543	2	75,88	1,31E-02	6,92E-02	2,55	0,88	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_71240	hypothetical protein

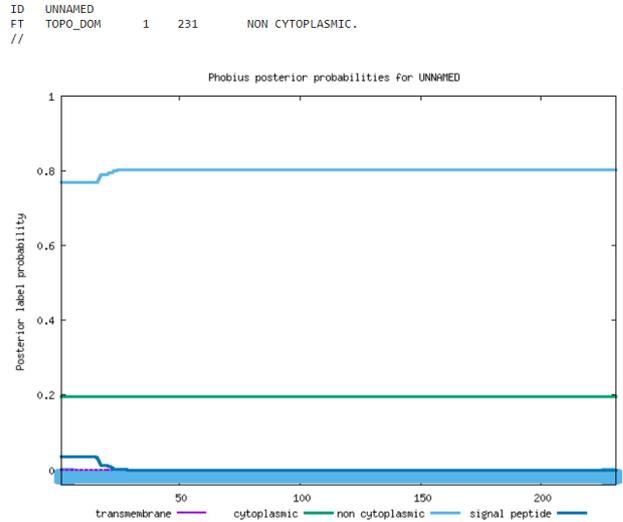
YP_793872.1 gi 116053545	3	124,21	8,80E-04	2,90E-02	5,35	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_71260	FMN oxidoreductase
YP_793885.1 gi 116053558	3	139,28	2,87E-03	4,37E-02	7,04	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_71410	ring hydroxylating dioxygenase, alpha-subunit
YP_793896.1 gi 116053569	4	236,05	1,22E-02	6,84E-02	3,10	0,89	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_71560	glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase
YP_793934.1 gi 116053607	2	43,17	3,47E-04	2,46E-02	1,90	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_72030	hypothetical protein
YP_793966.1 gi 116053639	5	373,5	8,96E-03	6,17E-02	1,97	0,94	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_72450	DsbA1
YP_793967.1 gi 116053640	5	377,49	9,26E-03	6,31E-02	1,75	0,93	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_72460	cytochrome c4
YP_793982.1 gi 116053655	8	358,77	1,61E-02	7,70E-02	1,94	0,84	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_72640	TonB-dependent receptor
YP_793984.1 gi 116053657	3	156,57	1,06E-02	6,67E-02	1,70	0,91	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_72660	hypothetical protein
YP_793985.1 gi 116053658	2	118,91	5,58E-04	2,67E-02	3,36	1,00	Biofilm $\Delta bacA$	Biofilm WT	PA14_72690	glutamine synthetase
YP_794023.1 gi 116053696	8	454	1,56E-04	2,46E-02	3,45	1,00	Biofilm WT	Biofilm $\Delta bacA$	PA14_73120	hypothetical protein

Annexe 2 : prédiction de la localisation de la protéine BacB par les logiciels DeepTMHMM (a) et Phobius (b). Structures secondaires prédites chez la protéine BacA par le logiciel PSiPRED (c).

a



b

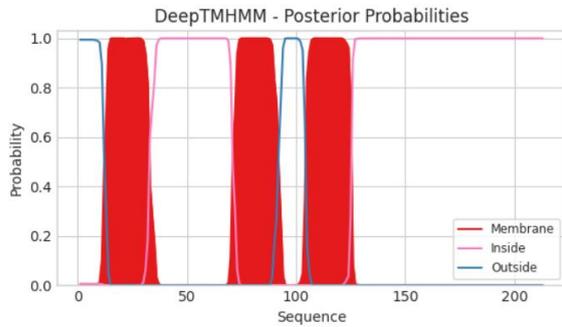


c

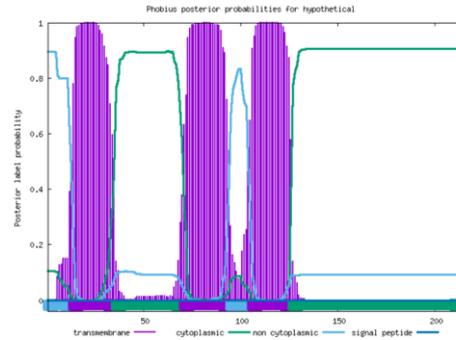


Annexe 3 : prédiction de la localisation de la protéine BacC par les logiciels DeepTMHMM (a) et Phobius (b). Structures secondaires prédites chez la protéine BacC par le logiciel PSiPRED (c).

a



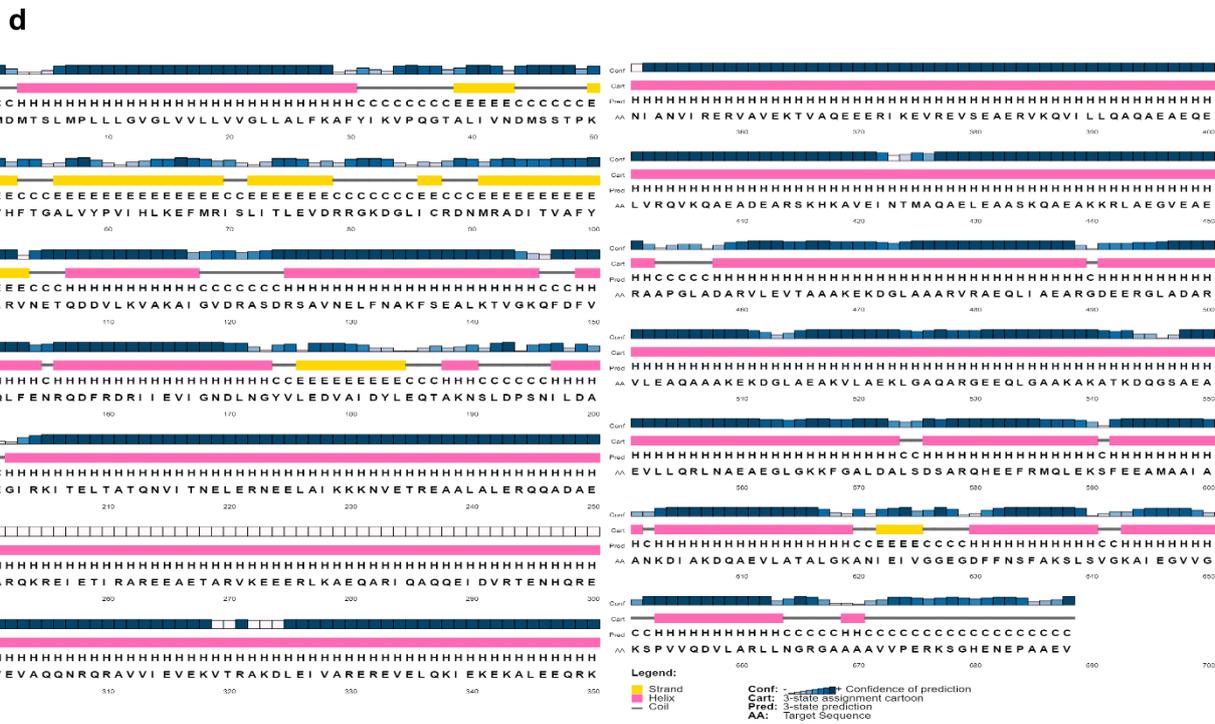
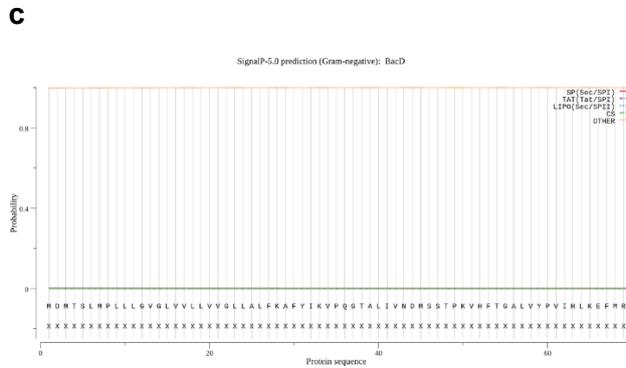
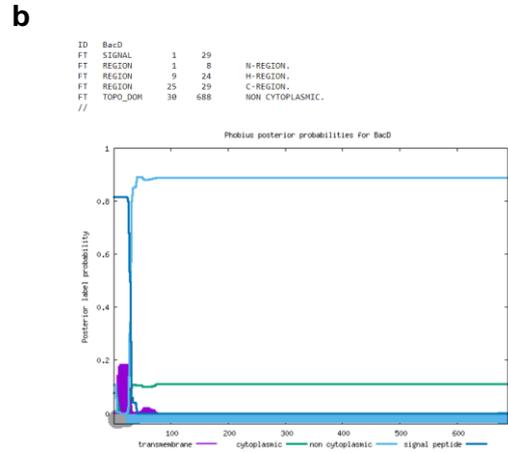
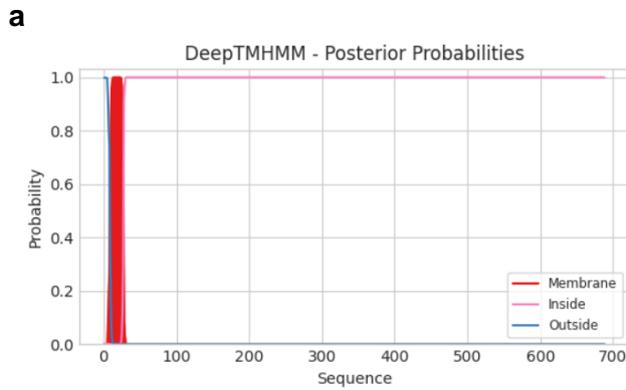
b



c

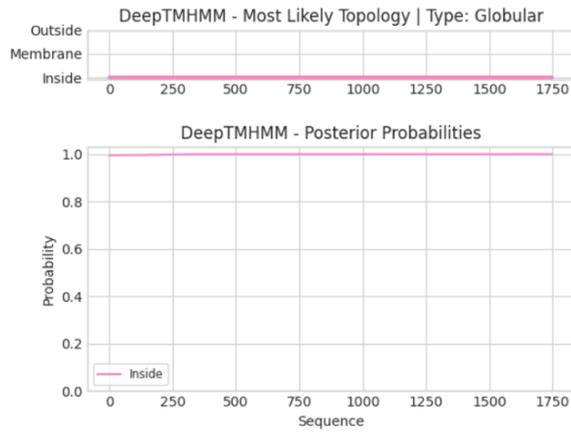


Annexe 4 : prédiction de la localisation de la protéine BacD par les logiciels DeepTMHMM (a), Phobius (b) et SignalP (c). Structures secondaires prédites chez la protéine BacD par le logiciel PSiPRED (d).

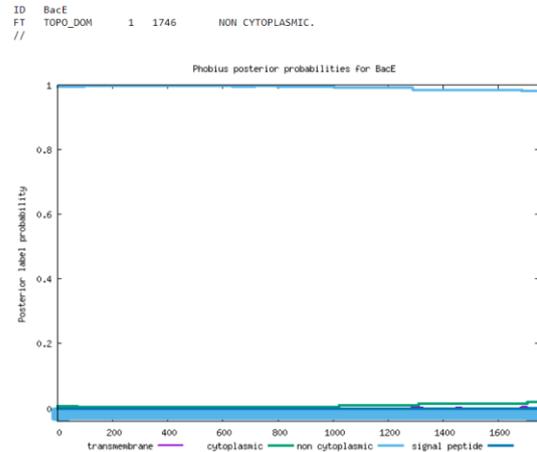


Annexe 5 : prédiction de la localisation de la protéine BacE par le logiciel DeepTMHMM (a) et Phobius (b).

a

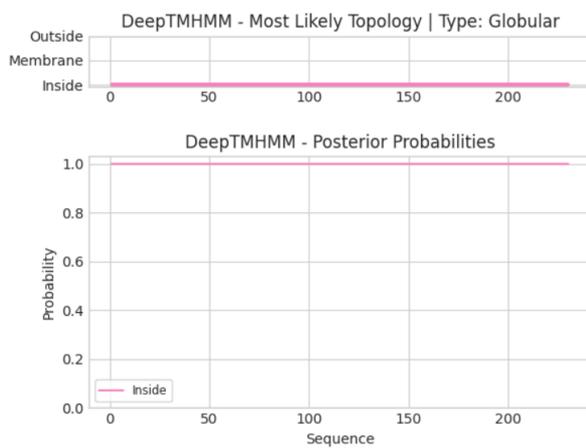


b

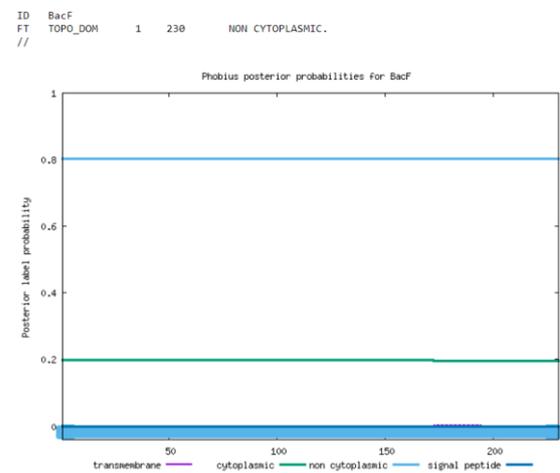


Annexe 6 : prédiction de la localisation de la protéine BacF par le logiciel DeepTMHMM (a) et Phobius (b).

a



b



Annexe 7 : Protéines différentiellement exprimées entre la fraction DSM et DRM

Accession	Peptide count	Confidence score	Anova (p)	q Value	Max fold change	Power	Highest mean condition	Lowest mean condition	Gene	Description
YP_788219.1	3	136,89	0,00E+00	1,00E-04	6,25	1,00	DRM	DSM	PA14_00750	hypothetical protein
YP_788220.1	2	109,59	3,00E-04	7,00E-04	209,22	1,00	DRM	DSM	PA14_00760	hypothetical protein
YP_788226.1	15	1998,79	0,00E+00	1,00E-04	14,61	1,00	DRM	DSM	PA14_00820	TagQ1
YP_788236.1	3	78,27	7,00E-04	1,30E-03	11,49	1,00	DRM	DSM	PA14_00960	TssJ1
YP_788272.1	6	550,85	3,00E-04	7,00E-04	4,90	1,00	DRM	DSM	PA14_01390	hypothetical protein
YP_788285.1	3	176,96	4,00E-04	8,00E-04	7,19	1,00	DRM	DSM	PA14_01550	lipoprotein
YP_788315.1	18	1396,31	5,00E-04	1,00E-03	8,74	1,00	DRM	DSM	PA14_01960	RND efflux membrane fusion protein
YP_788338.1	8	474,24	3,75E-02	2,59E-02	1,73	0,60	DRM	DSM	PA14_02270	chemotaxis transducer
YP_788446.1	2	140,99	4,10E-03	4,70E-03	6,38	0,95	DRM	DSM	PA14_03610	Zn-dependent protease with chaperone function
YP_788450.1	2	272,69	0,00E+00	2,00E-04	4,37	1,00	DRM	DSM	PA14_03670	sulfate transport protein CysW
YP_788474.1	17	785,98	0,00E+00	2,00E-04	6,12	1,00	DRM	DSM	PA14_03980	hypothetical protein
YP_788477.1	3	108,48	1,20E-03	1,90E-03	16,82	0,99	DRM	DSM	PA14_04020	hypothetical protein
YP_788478.1	10	468,24	0,00E+00	2,00E-04	10,78	1,00	DRM	DSM	PA14_04030	hypothetical protein
YP_788483.1	2	221,19	6,00E-04	1,10E-03	75,61	1,00	DRM	DSM	PA14_04080	ABC transporter permease

YP_788498. 1	8	579,53	1,50E-03	2,20E-03	5,07	0,99	DRM	DSM	PA14_0429 0	hypothetical protein
YP_788503. 1	2	108,68	5,00E-04	1,10E-03	13,43	1,00	DRM	DSM	PA14_0434 0	hypothetical protein
YP_788512. 1	6	315,53	3,00E-04	7,00E-04	4,36	1,00	DRM	DSM	PA14_0446 0	prolipoprotein diacylglyceryl transferase
YP_788516. 1	8	436,82	0,00E+0 0	1,00E-04	12,04	1,00	DRM	DSM	PA14_0452 0	hypothetical protein
YP_788536. 1	6	266,21	0,00E+0 0	2,00E-04	15,01	1,00	DRM	DSM	PA14_0478 0	LaoA
YP_788537. 1	2	62,45	4,00E-04	9,00E-04	105,64	1,00	DRM	DSM	PA14_0479 0	LaoB
YP_788544. 1	18	1033,25	7,00E-03	7,10E-03	2,11	0,90	DRM	DSM	PA14_0487 0	hypothetical protein
YP_788545. 1	18	1266,11	4,50E-03	5,00E-03	2,05	0,94	DRM	DSM	PA14_0489 0	zinc protease
YP_788547. 1	10	526,84	9,60E-03	9,00E-03	1,87	0,86	DRM	DSM	PA14_0491 0	cell division ATP-binding protein FtsE
YP_788548. 1	7	410,2	2,00E-04	7,00E-04	5,82	1,00	DRM	DSM	PA14_0492 0	cell division protein FtsX
YP_788550. 1	6	362,8	7,00E-04	1,30E-03	14,61	1,00	DRM	DSM	PA14_0494 0	hypothetical protein
YP_788566. 1	2	131,53	0,00E+0 0	2,00E-04	72,61	1,00	DRM	DSM	PA14_0513 0	hypothetical protein
YP_788571. 1	4	261,18	0,00E+0 0	2,00E-04	13,97	1,00	DRM	DSM	PA14_0520 0	cation efflux system protein
YP_788580. 1	3	80,09	1,00E-04	5,00E-04	3,76	1,00	DRM	DSM	PA14_0530 0	TonB domain-containing protein
YP_788585. 1	17	1328,44	5,00E-04	1,00E-03	2,40	1,00	DRM	DSM	PA14_0536 0	twitching motility protein PilJ
YP_788596. 1	2	77,58	1,00E-04	4,00E-04	6,57	1,00	DRM	DSM	PA14_0550 0	hypothetical protein

YP_788599. 1	24	2115,78	2,60E-03	3,30E-03	3,96	0,97	DRM	DSM	PA14_0553 0	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA
YP_788624. 1	2	73,12	1,40E-03	2,10E-03	4,51	0,99	DRM	DSM	PA14_0588 0	membrane-bound protease
YP_788634. 1	2	110,34	1,03E-02	9,50E-03	2,05	0,85	DRM	DSM	PA14_0603 0	acyltransferase
YP_788636. 1	2	61,54	2,24E-02	1,73E-02	4,84	0,71	DRM	DSM	PA14_0606 0	DNA-binding response regulator CreB
YP_788686. 1	13	718,86	5,00E-04	1,10E-03	3,35	1,00	DRM	DSM	PA14_0672 0	heme d1 biosynthesis protein NirF
YP_788693. 1	4	282,47	0,00E+0 0	2,00E-04	6,28	1,00	DRM	DSM	PA14_0681 0	nitric-oxide reductase subunit C
YP_788694. 1	2	107,2	6,00E-04	1,20E-03	3,03	1,00	DRM	DSM	PA14_0683 0	nitric-oxide reductase subunit B
YP_788711. 1	3	132,38	1,00E-04	3,00E-04	13,31	1,00	DRM	DSM	PA14_0702 0	hypothetical protein
YP_788712. 1	8	432,02	0,00E+0 0	1,00E-04	9,67	1,00	DRM	DSM	PA14_0703 0	cytochrome c'
YP_788750. 1	2	117,61	1,60E-03	2,40E-03	4,75	0,99	DRM	DSM	PA14_0753 0	DNA primase
YP_788754. 1	3	124,61	4,90E-03	5,30E-03	4,25	0,93	DRM	DSM	PA14_0758 0	glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsY
YP_788768. 1	54	3314,69	6,00E-04	1,20E-03	5,53	1,00	DRM	DSM	PA14_0777 0	organic solvent tolerance protein OstA
YP_788829. 1	4	165,02	7,00E-04	1,30E-03	9,47	1,00	DRM	DSM	PA14_0845 0	hypothetical protein
YP_788848. 1	9	1154,96	1,43E-02	1,22E-02	6,56	0,80	DRM	DSM	PA14_0875 0	50S ribosomal protein L7/L12
YP_788864. 1	3	385,68	3,64E-02	2,53E-02	6,39	0,61	DRM	DSM	PA14_0893 0	50S ribosomal protein L29
YP_788876. 1	13	1112,48	1,00E-04	4,00E-04	3,25	1,00	DRM	DSM	PA14_0905 0	preprotein translocase subunit SecY

YP_788886. 1	3	320,56	1,00E-04	3,00E-04	3,01	1,00	DRM	DSM	PA14_0919 5	major facilitator transporter
YP_788889. 1	5	405,5	2,03E-02	1,60E-02	2,84	0,73	DRM	DSM	PA14_0922 0	isochorismate-pyruvate lyase
YP_788891. 1	19	1195,01	2,45E-02	1,86E-02	1,64	0,69	DRM	DSM	PA14_0924 0	pyochelin biosynthesis protein PchD
YP_788893. 1	49	4150,08	4,40E-03	5,00E-03	1,97	0,94	DRM	DSM	PA14_0927 0	dihydroaeruginosic acid synthetase
YP_788894. 1	55	4613,41	1,00E-03	1,60E-03	3,00	1,00	DRM	DSM	PA14_0928 0	pyochelin synthetase
YP_788896. 1	13	880,71	1,40E-03	2,10E-03	2,21	0,99	DRM	DSM	PA14_0930 0	ABC transporter ATP-binding protein
YP_788914. 1	6	610,4	0,00E+0 0	2,00E-04	7,01	1,00	DRM	DSM	PA14_0954 0	hypothetical protein
YP_789005. 1	4	188,16	1,88E-02	1,50E-02	1,60	0,75	DRM	DSM	PA14_1070 0	bacteriophytochrome
YP_789042. 1	66	4985,76	5,50E-03	5,80E-03	3,29	0,92	DRM	DSM	PA14_1114 0	nonribosomal peptide synthetase
YP_789055. 1	5	256,45	1,00E-04	4,00E-04	6,03	1,00	DRM	DSM	PA14_1129 0	permease
YP_789061. 1	3	166,52	2,20E-03	2,90E-03	6,14	0,98	DRM	DSM	PA14_1137 0	lipoprotein
YP_789069. 1	2	67,75	1,00E-04	4,00E-04	17,82	1,00	DRM	DSM	PA14_1147 0	phosphatidylglycerophosphatase A
YP_789126. 1	13	943,28	7,90E-03	7,70E-03	2,13	0,89	DRM	DSM	PA14_1216 0	murein transglycosylase
YP_789130. 1	10	885,32	2,00E-03	2,70E-03	3,50	0,98	DRM	DSM	PA14_1221 0	hypothetical protein
YP_789133. 1	3	202,11	3,00E-04	7,00E-04	7,01	1,00	DRM	DSM	PA14_1227 0	hypothetical protein
YP_789134. 1	8	531,18	1,20E-03	1,90E-03	3,35	0,99	DRM	DSM	PA14_1228 0	apolipoprotein N-acyltransferase
YP_789140. 1	7	382,05	2,20E-03	2,90E-03	5,61	0,98	DRM	DSM	PA14_1237 0	hypothetical protein

YP_789148. 1	2	58,63	6,00E-04	1,20E-03	7,36	1,00	DRM	DSM	PA14_1253 0	hypothetical protein
YP_789159. 1	10	670,67	7,10E-03	7,10E-03	4,13	0,90	DRM	DSM	PA14_1267 0	hypothetical protein
YP_789165. 1	2	79,49	4,60E-03	5,10E-03	22,25	0,94	DRM	DSM	PA14_1274 0	hypothetical protein
YP_789183. 1	9	689,54	1,00E-04	3,00E-04	20,95	1,00	DRM	DSM	PA14_1298 0	hypothetical protein
YP_789184. 1	5	256,25	3,00E-04	8,00E-04	3,31	1,00	DRM	DSM	PA14_1299 0	choline transporter
YP_789187. 1	17	928,99	0,00E+0 0	1,00E-04	6,80	1,00	DRM	DSM	PA14_1303 0	CioA, cyanide insensitive terminal oxidase
YP_789196. 1	4	204,41	3,00E-04	8,00E-04	7,31	1,00	DRM	DSM	PA14_1315 0	transcriptional regulator
YP_789197. 1	16	1005,02	3,90E-03	4,60E-03	1,90	0,95	DRM	DSM	PA14_1317 0	metal transporting P-type ATPase
YP_789230. 1	4	305	0,00E+0 0	2,00E-04	22,10	1,00	DRM	DSM	PA14_1359 0	ABC transporter permease
YP_789232. 1	3	162,14	0,00E+0 0	2,00E-04	7,89	1,00	DRM	DSM	PA14_1361 0	ABC transporter permease
YP_789233. 1	2	95,68	3,84E-02	2,65E-02	2,56	0,60	DRM	DSM	PA14_1362 0	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaP
YP_789243. 1	5	166,65	1,06E-02	9,70E-03	2,63	0,84	DRM	DSM	PA14_1374 0	two-component sensor NarX
YP_789249. 1	2	112,6	6,20E-03	6,40E-03	2,60	0,91	DRM	DSM	PA14_1383 0	respiratory nitrate reductase gamma chain
YP_789301. 1	11	578,35	2,50E-03	3,20E-03	2,06	0,98	DRM	DSM	PA14_1450 0	hypothetical protein
YP_789302. 1	6	293,74	1,00E-04	4,00E-04	2,60	1,00	DRM	DSM	PA14_1451 0	hypothetical protein
YP_789310. 1	2	272,05	4,31E-02	2,90E-02	2,02	0,57	DRM	DSM	PA14_1461 0	preprotein translocase subunit YajC
YP_789311. 1	34	2582,53	1,00E-04	4,00E-04	4,20	1,00	DRM	DSM	PA14_1463 0	preprotein translocase subunit SecD

YP_789312. 1	8	863,34	1,00E-04	4,00E-04	5,06	1,00	DRM	DSM	PA14_1465 0	preprotein translocase subunit SecF
YP_789327. 1	15	1299,79	1,00E-04	4,00E-04	10,33	1,00	DRM	DSM	PA14_1485 0	type 4 fimbrial biogenesis protein PilF
YP_789328. 1	8	690,24	1,00E-03	1,60E-03	4,08	1,00	DRM	DSM	PA14_1486 0	hypothetical protein
YP_789331. 1	14	1314,35	1,00E-04	4,00E-04	5,70	1,00	DRM	DSM	PA14_1490 0	hypothetical protein
YP_789332. 1	20	1954,35	4,00E-04	1,00E-03	6,16	1,00	DRM	DSM	PA14_1491 0	hypothetical protein
YP_789343. 1	6	289,5	5,00E-04	1,00E-03	4,66	1,00	DRM	DSM	PA14_1508 0	hypothetical protein
YP_789386. 1	7	284,66	4,20E-02	2,85E-02	1,84	0,58	DRM	DSM	PA14_1558 0	Type II restriction enzyme, methylase subunit
YP_789389. 1	10	591,78	4,80E-03	5,30E-03	1,74	0,94	DRM	DSM	PA14_1561 0	hypothetical protein
YP_789394. 1	16	885,77	0,00E+0 0	2,00E-04	4,06	1,00	DRM	DSM	PA14_1567 0	metallo-oxidoreductase
YP_789398. 1	22	1384,63	0,00E+0 0	1,00E-04	10,20	1,00	DRM	DSM	PA14_1572 0	transglycosylase
YP_789402. 1	4	228,79	2,65E-02	1,99E-02	2,49	0,68	DRM	DSM	PA14_1578 0	PTS system N-acetylglucosamine-specific IIBC component
YP_789429. 1	4	239,4	5,00E-04	1,00E-03	4,68	1,00	DRM	DSM	PA14_1610 0	hypothetical protein
YP_789446. 1	2	96,78	2,70E-03	3,40E-03	3,39	0,97	DRM	DSM	PA14_1631 0	MFS permease
YP_789448. 1	14	1011,83	6,70E-03	6,80E-03	7,26	0,91	DRM	DSM	PA14_1633 0	hypothetical protein
YP_789452. 1	13	935,78	0,00E+0 0	0,00E+0 0	3,14	1,00	DRM	DSM	PA14_1637 0	hypothetical protein
YP_789454. 1	7	326,57	1,00E-04	4,00E-04	4,40	1,00	DRM	DSM	PA14_1639 0	GMC-type oxidoreductase

YP_789456. 1	22	1368,64	9,00E-04	1,60E-03	1,52	1,00	DRM	DSM	PA14_1643 0	chemotaxis transducer
YP_789469. 1	6	347,33	8,00E-04	1,40E-03	4,47	1,00	DRM	DSM	PA14_1660 0	alpha/beta hydrolase
YP_789470. 1	4	168,31	0,00E+0 0	2,00E-04	5,81	1,00	DRM	DSM	PA14_1661 0	hypothetical protein
YP_789472. 1	24	2550,2	0,00E+0 0	2,00E-04	7,14	1,00	DRM	DSM	PA14_1663 0	outer membrane protein, OmpA
YP_789473. 1	9	752,99	1,00E-04	3,00E-04	25,95	1,00	DRM	DSM	PA14_1664 0	lipoprotein
YP_789482. 1	6	295,02	1,64E-02	1,34E-02	1,64	0,77	DRM	DSM	PA14_1674 0	hypothetical protein
YP_789490. 1	6	455,81	0,00E+0 0	1,00E-04	12,37	1,00	DRM	DSM	PA14_1684 0	lipoprotein
YP_789495. 1	7	243,31	2,40E-03	3,10E-03	6,56	0,98	DRM	DSM	PA14_1691 0	hypothetical protein
YP_789513. 1	2	108,79	1,00E-04	4,00E-04	5,37	1,00	DRM	DSM	PA14_1712 0	phosphatidate cytidyltransferase
YP_789515. 1	4	218,63	1,40E-03	2,10E-03	2,32	0,99	DRM	DSM	PA14_1714 0	membrane-associated zinc metalloprotease
YP_789516. 1	30	2368,33	2,00E-04	6,00E-04	5,55	1,00	DRM	DSM	PA14_1715 0	outer membrane antigen
YP_789525. 1	21	1777,29	3,70E-03	4,30E-03	1,94	0,96	DRM	DSM	PA14_1727 0	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha
YP_789544. 1	2	62,11	1,57E-02	1,30E-02	2,35	0,78	DRM	DSM	PA14_1750 0	DNA mismatch repair protein MutS
YP_789551. 1	22	1285,67	3,68E-02	2,55E-02	1,74	0,61	DRM	DSM	PA14_1758 0	hypothetical protein
YP_789562. 1	16	956,47	6,00E-04	1,20E-03	3,20	1,00	DRM	DSM	PA14_1769 0	hypothetical protein
YP_789580. 1	2	80,68	1,12E-02	1,01E-02	10,22	0,84	DRM	DSM	PA14_1793 0	glycerol-3-phosphate dehydrogenase

YP_789627. 1	2	46,91	4,54E-02	3,03E-02	3,19	0,56	DRM	DSM	PA14_1860 0	ABC transporter ATP-binding protein
YP_789662. 1	2	157,46	2,00E-04	5,00E-04	21,23	1,00	DRM	DSM	PA14_1901 0	Tsi3
YP_789664. 1	10	860,4	1,00E-04	3,00E-04	4,93	1,00	DRM	DSM	PA14_1903 0	hypothetical protein
YP_789669. 1	5	219,59	1,72E-02	1,39E-02	1,52	0,76	DRM	DSM	PA14_1911 0	rhamnosyltransferase chain B
YP_789676. 1	11	693,03	8,40E-03	8,20E-03	3,43	0,88	DRM	DSM	PA14_1919 0	malate dehydrogenase
YP_789682. 1	8	779,79	2,00E-03	2,70E-03	3,01	0,98	DRM	DSM	PA14_1931 0	hypothetical protein
YP_789691. 1	3	97,46	3,36E-02	2,37E-02	2,15	0,63	DRM	DSM	PA14_1940 0	5-methylaminomethyl-2-thiouridine methyltransferase
YP_789695. 1	32	1677,93	3,00E-03	3,70E-03	4,62	0,97	DRM	DSM	PA14_1947 0	malate:quinone oxidoreductase
YP_789708. 1	4	283,62	3,12E-02	2,24E-02	2,68	0,64	DRM	DSM	PA14_1961 0	hypothetical protein
YP_789747. 1	6	307,79	6,80E-03	6,90E-03	3,54	0,90	DRM	DSM	PA14_2008 0	hypothetical protein
YP_789753. 1	5	223,14	1,00E-04	3,00E-04	6,14	1,00	DRM	DSM	PA14_2015 0	NosL protein
YP_789790. 1	4	241,23	2,10E-03	2,80E-03	9,88	0,98	DRM	DSM	PA14_2060 0	hypothetical protein
YP_789812. 1	10	529,84	6,30E-03	6,50E-03	3,27	0,91	DRM	DSM	PA14_2086 0	Tfp pilus assembly protein FimV
YP_789835. 1	8	606,63	0,00E+0 0	1,00E-04	11,66	1,00	DRM	DSM	PA14_2113 0	outer membrane lipoprotein
YP_789849. 1	3	132,04	3,15E-02	2,25E-02	1,98	0,64	DRM	DSM	PA14_2129 0	hypothetical protein
YP_789854. 1	28	2267,52	2,44E-02	1,86E-02	4,78	0,69	DRM	DSM	PA14_2137 0	long-chain-fatty-acid--CoA ligase
YP_789864. 1	2	121,45	5,00E-04	1,00E-03	5,10	1,00	DRM	DSM	PA14_2151 0	hypothetical protein

YP_789883. 1	3	172,81	2,60E-03	3,30E-03	2,43	0,97	DRM	DSM	PA14_2170 0	two-component sensor
YP_789887. 1	3	118,01	1,80E-02	1,44E-02	2,64	0,76	DRM	DSM	PA14_2175 0	hypothetical protein
YP_789892. 1	25	2294,62	0,00E+0 0	1,00E-04	23,42	1,00	DRM	DSM	PA14_2182 0	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type
YP_789913. 1	3	90,1	3,00E-04	7,00E-04	2,76	1,00	DRM	DSM	PA14_2205 0	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase
YP_789935. 1	8	421,63	1,25E-02	1,10E-02	2,61	0,82	DRM	DSM	PA14_2231 0	hypothetical protein
YP_789965. 1	9	565,7	3,00E-04	7,00E-04	6,41	1,00	DRM	DSM	PA14_2265 0	ABC transporter
YP_789966. 1	15	1096,53	2,00E-03	2,70E-03	2,94	0,98	DRM	DSM	PA14_2266 0	hypothetical protein
YP_789968. 1	7	460,05	9,80E-03	9,30E-03	2,19	0,86	DRM	DSM	PA14_2268 0	ABC transporter permease
YP_789976. 1	2	79,02	9,00E-04	1,60E-03	7,70	1,00	DRM	DSM	PA14_2277 0	hypothetical protein
YP_789991. 1	8	343,86	0,00E+0 0	1,00E-04	4,02	1,00	DRM	DSM	PA14_2299 0	ABC sugar transporter permease
YP_789992. 1	2	66,95	7,00E-04	1,20E-03	2,23	1,00	DRM	DSM	PA14_2300 0	ABC sugar transporter permease
YP_790009. 1	16	1479,77	4,90E-03	5,40E-03	4,68	0,93	DRM	DSM	PA14_2322 0	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase
YP_790061. 1	10	599,17	8,80E-03	8,50E-03	1,66	0,87	DRM	DSM	PA14_2386 0	acetyl-CoA carboxylase subunit beta
YP_790069. 1	3	206,24	1,50E-03	2,20E-03	11,38	0,99	DRM	DSM	PA14_2398 0	secretion protein XcpP
YP_790072. 1	8	633,58	0,00E+0 0	1,00E-04	16,25	1,00	DRM	DSM	PA14_2402 0	general secretion pathway protein G
YP_790075. 1	2	259,47	3,80E-03	4,40E-03	3,83	0,95	DRM	DSM	PA14_2406 0	general secretion pathway protein J
YP_790076. 1	2	76,22	1,00E-04	4,00E-04	4,62	1,00	DRM	DSM	PA14_2407 0	general secretion pathway protein K

YP_790077. 1	6	312,28	4,60E-03	5,10E-03	3,20	0,94	DRM	DSM	PA14_2408 0	general secretion pathway protein L
YP_790078. 1	4	182,47	1,20E-03	1,90E-03	11,29	0,99	DRM	DSM	PA14_2410 0	general secretion pathway protein M
YP_790080. 1	8	591,04	3,56E-02	2,49E-02	2,82	0,61	DRM	DSM	PA14_2415 0	hypothetical protein
YP_790087. 1	2	91,29	1,10E-03	1,80E-03	6,04	0,99	DRM	DSM	PA14_2424 0	hypothetical protein
YP_790091. 1	7	345,22	9,00E-04	1,50E-03	5,57	1,00	DRM	DSM	PA14_2429 0	glycine betaine transmethylase
YP_790094. 1	3	124,37	9,90E-03	9,30E-03	2,99	0,86	DRM	DSM	PA14_2433 0	hypothetical protein
YP_790099. 1	19	1222,03	0,00E+0 0	2,00E-04	7,41	1,00	DRM	DSM	PA14_2438 0	hypothetical protein
YP_790100. 1	6	279,39	3,30E-02	2,35E-02	2,60	0,63	DRM	DSM	PA14_2439 0	hypothetical protein
YP_790101. 1	2	103,81	1,48E-02	1,24E-02	87,86	0,79	DRM	DSM	PA14_2440 0	von Willebrand factor A
YP_790121. 1	16	1079,9	1,10E-03	1,70E-03	5,23	1,00	DRM	DSM	PA14_2464 0	dihydroorotate dehydrogenase 2
YP_790130. 1	2	153,01	4,78E-02	3,16E-02	2,55	0,55	DRM	DSM	PA14_2474 0	hypothetical protein
YP_790131. 1	3	256,5	2,70E-03	3,40E-03	3,72	0,97	DRM	DSM	PA14_2476 0	hypothetical protein
YP_790141. 1	2	480,69	0,00E+0 0	1,00E-04	120,79	1,00	DRM	DSM	PA14_2488 0	lipoprotein
YP_790172. 1	2	104,56	1,00E-04	3,00E-04	2,75	1,00	DRM	DSM	PA14_2527 0	aromatic amino acid transport protein AroP1
YP_790174. 1	3	119,41	2,76E-02	2,05E-02	1,89	0,67	DRM	DSM	PA14_2530 5	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B
YP_790175. 1	8	485,8	0,00E+0 0	1,00E-04	2,70	1,00	DRM	DSM	PA14_2532 0	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C
YP_790176. 1	4	160,36	7,00E-04	1,20E-03	3,59	1,00	DRM	DSM	PA14_2533 0	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit D

YP_790179. 1	11	783,88	0,00E+0 0	1,00E-04	7,12	1,00	DRM	DSM	PA14_2536 0	thiamine biosynthesis lipoprotein
YP_790190. 1	5	373,6	0,00E+0 0	2,00E-04	22,63	1,00	DRM	DSM	PA14_2549 0	tolQ-type transport protein
YP_790204. 1	2	106,35	0,00E+0 0	1,00E-04	4,85	1,00	DRM	DSM	PA14_2564 0	glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX
YP_790220. 1	39	3330,36	0,00E+0 0	1,00E-04	8,62	1,00	DRM	DSM	PA14_2584 0	electron transfer flavoprotein- ubiquinone oxidoreductase
YP_790224. 1	10	569,81	0,00E+0 0	1,00E-04	7,71	1,00	DRM	DSM	PA14_2591 0	lipase
YP_790234. 1	13	815,63	1,00E-04	3,00E-04	3,64	1,00	DRM	DSM	PA14_2602 0	aminopeptidase
YP_790273. 1	4	226,07	1,70E-03	2,40E-03	3,85	0,99	DRM	DSM	PA14_2655 0	lipoprotein
YP_790274. 1	14	1431,75	1,10E-03	1,70E-03	4,19	1,00	DRM	DSM	PA14_2656 0	outer membrane protein
YP_790278. 1	3	128,16	1,09E-02	9,90E-03	4,25	0,84	DRM	DSM	PA14_2660 0	SbrI
YP_790291. 1	2	189,42	9,00E-04	1,50E-03	17,90	1,00	DRM	DSM	PA14_2678 0	hypothetical protein
YP_790307. 1	24	2399,5	0,00E+0 0	1,00E-04	7,30	1,00	DRM	DSM	PA14_2700 0	chemotaxis transducer
YP_790310. 1	3	334,43	0,00E+0 0	1,00E-04	7,49	1,00	DRM	DSM	PA14_2707 0	hypothetical protein
YP_790343. 1	15	1296,94	0,00E+0 0	1,00E-04	5,53	1,00	DRM	DSM	PA14_2748 0	heat shock protein HtpX
YP_790353. 1	4	193,04	3,08E-02	2,22E-02	3,77	0,65	DRM	DSM	PA14_2759 0	hypothetical protein
YP_790364. 1	59	5163,09	0,00E+0 0	1,00E-04	14,26	1,00	DRM	DSM	PA14_2773 0	acyl-CoA dehydrogenase
YP_790368. 1	3	295,53	0,00E+0 0	2,00E-04	7,72	1,00	DRM	DSM	PA14_2778 0	ABC transporter permease
YP_790391. 1	20	1809,35	1,00E-04	4,00E-04	3,81	1,00	DRM	DSM	PA14_2805 0	chemotaxis transducer

YP_790402. 1	3	99,68	7,00E-04	1,30E-03	6,54	1,00	DRM	DSM	PA14_2817 0	formate/nitrate transporter
YP_790403. 1	18	1160,87	2,00E-04	7,00E-04	3,99	1,00	DRM	DSM	PA14_2818 0	hypothetical protein
YP_790435. 1	2	89,08	1,00E-04	3,00E-04	40,48	1,00	DRM	DSM	PA14_2853 0	hypothetical protein
YP_790487. 1	2	121,34	1,22E-02	1,08E-02	2,55	0,82	DRM	DSM	PA14_2912 0	hypothetical protein
YP_790500. 1	2	104,53	5,50E-03	5,80E-03	6,81	0,93	DRM	DSM	PA14_2927 0	outer membrane lipoprotein
YP_790542. 1	24	1407,97	1,00E-04	4,00E-04	2,42	1,00	DRM	DSM	PA14_2980 0	chemotaxis transducer
YP_790545. 1	4	247,61	0,00E+0 0	0,00E+0 0	26,66	1,00	DRM	DSM	PA14_2985 0	NADH dehydrogenase subunit N
YP_790546. 1	5	371,55	0,00E+0 0	0,00E+0 0	8,02	1,00	DRM	DSM	PA14_2986 0	NADH dehydrogenase subunit M
YP_790547. 1	4	263,45	1,00E-04	3,00E-04	3,64	1,00	DRM	DSM	PA14_2988 0	NADH dehydrogenase subunit L
YP_790551. 1	9	564,64	0,00E+0 0	0,00E+0 0	9,11	1,00	DRM	DSM	PA14_2993 0	NADH dehydrogenase subunit H
YP_790557. 1	2	174,62	0,00E+0 0	1,00E-04	14,79	1,00	DRM	DSM	PA14_3002 0	NADH dehydrogenase subunit A
YP_790590. 1	2	350,84	0,00E+0 0	1,00E-04	52,07	1,00	DRM	DSM	PA14_3041 0	hypothetical protein
YP_790607. 1	30	2175,8	0,00E+0 0	1,00E-04	3,40	1,00	DRM	DSM	PA14_3063 0	FAD-dependent monooxygenase
YP_790610. 1	3	153,26	6,30E-03	6,50E-03	11,05	0,91	DRM	DSM	PA14_3067 0	CDP-diacylglycerol--glycerol-3- phosphate 3- phosphatidyltransferase
YP_790622. 1	10	668,73	3,00E-04	7,00E-04	1,67	1,00	DRM	DSM	PA14_3082 0	methyl-accepting chemotaxis transducer
YP_790638. 1	4	189,74	3,30E-03	4,00E-03	3,63	0,96	DRM	DSM	PA14_3099 0	hypothetical protein

YP_790670. 1	3	121,76	4,39E-02	2,95E-02	2,41	0,57	DRM	DSM	PA14_3136 0	hypothetical protein
YP_790677. 1	5	556,05	1,00E-04	3,00E-04	15,89	1,00	DRM	DSM	PA14_3144 0	hypothetical protein
YP_790694. 1	9	499,56	2,00E-04	5,00E-04	7,44	1,00	DRM	DSM	PA14_3168 0	hypothetical protein
YP_790701. 1	2	116,45	0,00E+0 0	2,00E-04	17,27	1,00	DRM	DSM	PA14_3176 0	phosphatidate cytidyltransferase
YP_790760. 1	5	299,67	1,00E-04	3,00E-04	24,99	1,00	DRM	DSM	PA14_3260 0	thiol:disulfide interchange protein
YP_790783. 1	2	108,96	1,00E-03	1,60E-03	16,68	1,00	DRM	DSM	PA14_3289 0	hypothetical protein
YP_790827. 1	26	1940,62	0,00E+0 0	1,00E-04	13,21	1,00	DRM	DSM	PA14_3345 0	trehalase
YP_790829. 1	13	819,28	2,00E-04	6,00E-04	5,94	1,00	DRM	DSM	PA14_3348 0	L-sorbose dehydrogenase
YP_790854. 1	3	115,06	1,90E-03	2,60E-03	6,93	0,98	DRM	DSM	PA14_3378 0	transmembrane sensor
YP_790877. 1	2	112,5	3,80E-02	2,62E-02	3,80	0,60	DRM	DSM	PA14_3405 0	HsiC3
YP_790908. 1	7	408,12	2,87E-02	2,11E-02	2,28	0,66	DRM	DSM	PA14_3446 0	hypothetical protein
YP_790912. 1	4	321,84	1,41E-02	1,20E-02	10,94	0,80	DRM	DSM	PA14_3452 0	ABC transporter permease
YP_790918. 1	3	159,85	5,00E-04	1,00E-03	3,90	1,00	DRM	DSM	PA14_3463 0	gluconate permease
YP_790934. 1	9	546,97	4,10E-03	4,70E-03	2,02	0,95	DRM	DSM	PA14_3481 0	non-ribosomal peptide synthetase
YP_790937. 1	49	3265,37	4,10E-03	4,70E-03	2,22	0,95	DRM	DSM	PA14_3484 0	non-ribosomal peptide synthetase
YP_790946. 1	38	2755,95	4,00E-03	4,60E-03	6,20	0,95	DRM	DSM	PA14_3497 0	glucose dehydrogenase
YP_790972. 1	2	133,2	1,40E-03	2,10E-03	9,60	0,99	DRM	DSM	PA14_3530 0	hypothetical protein

YP_791055. 1	3	136,01	6,20E-03	6,40E-03	3,74	0,91	DRM	DSM	PA14_3631 0	hydrogen cyanide synthase HcnC
YP_791166. 1	2	158,29	1,80E-02	1,44E-02	2,07	0,76	DRM	DSM	PA14_3769 0	sensory box protein
YP_791170. 1	2	67,22	2,90E-03	3,60E-03	7,80	0,97	DRM	DSM	PA14_3776 0	MFS transporter
YP_791235. 1	9	408,91	7,00E-04	1,30E-03	3,68	1,00	DRM	DSM	PA14_3858 0	hypothetical protein
YP_791271. 1	4	381,98	0,00E+0 0	1,00E-04	10,69	1,00	DRM	DSM	PA14_3907 0	hypothetical protein
YP_791289. 1	4	337,15	3,00E-03	3,70E-03	5,57	0,97	DRM	DSM	PA14_3927 0	hypothetical protein
YP_791292. 1	2	115,96	1,00E-04	3,00E-04	6,52	1,00	DRM	DSM	PA14_3932 0	membrane protein component of ABC ribose transporter
YP_791350. 1	3	362,09	8,00E-04	1,40E-03	4,61	1,00	DRM	DSM	PA14_4008 0	hypothetical protein
YP_791364. 1	3	162,23	1,00E-04	4,00E-04	3,12	1,00	DRM	DSM	PA14_4025 0	outer membrane protein
YP_791380. 1	18	1330,4	0,00E+0 0	1,00E-04	6,56	1,00	DRM	DSM	PA14_4043 0	hypothetical protein
YP_791381. 1	2	68,02	3,75E-02	2,60E-02	1,82	0,60	DRM	DSM	PA14_4044 0	LysR family transcriptional regulator
YP_791384. 1	6	416,99	4,00E-04	9,00E-04	4,60	1,00	DRM	DSM	PA14_4049 0	hypothetical protein
YP_791424. 1	2	75,91	1,41E-02	1,20E-02	1,60	0,80	DRM	DSM	PA14_4101 0	amino acid permease
YP_791434. 1	7	463,3	1,00E-04	3,00E-04	3,63	1,00	DRM	DSM	PA14_4114 0	peptidyl nucleoside antibiotic ABC transporter permease NppB
YP_791453. 1	3	203,07	1,00E-04	4,00E-04	3,14	1,00	DRM	DSM	PA14_4140 0	UDP-2,3-diacetylglucosamine hydrolase
YP_791478. 1	14	863,35	1,08E-02	9,90E-03	2,29	0,84	DRM	DSM	PA14_4171 0	hypothetical protein

YP_791500. 1	5	317,66	0,00E+0 0	1,00E-04	3,17	1,00	DRM	DSM	PA14_4198 0	hypothetical protein
YP_791536. 1	4	209,16	5,10E-03	5,50E-03	5,98	0,93	DRM	DSM	PA14_4244 0	translocator outer membrane protein PopD precursor
YP_791537. 1	8	389,78	1,90E-03	2,70E-03	3,64	0,98	DRM	DSM	PA14_4245 0	translocator protein PopB
YP_791556. 1	12	688,26	7,90E-03	7,80E-03	2,46	0,89	DRM	DSM	PA14_4267 0	hypothetical protein
YP_791598. 1	4	205,48	0,00E+0 0	1,00E-04	9,72	1,00	DRM	DSM	PA14_4315 0	hypothetical protein
YP_791599. 1	2	178,86	3,00E-04	8,00E-04	9,10	1,00	DRM	DSM	PA14_4316 0	transporter
YP_791610. 1	4	190,71	6,00E-04	1,20E-03	7,15	1,00	DRM	DSM	PA14_4329 0	lipoprotein
YP_791636. 1	4	462,78	0,00E+0 0	1,00E-04	13,20	1,00	DRM	DSM	PA14_4363 0	lipase
YP_791638. 1	4	213,77	1,40E-03	2,10E-03	8,10	0,99	DRM	DSM	PA14_4365 0	hypothetical protein
YP_791643. 1	4	469,65	9,50E-03	9,00E-03	5,31	0,86	DRM	DSM	PA14_4371 0	methyl-accepting chemotaxis transducer
YP_791659. 1	2	70,21	0,00E+0 0	2,00E-04	70,53	1,00	DRM	DSM	PA14_4390 0	hypothetical protein
YP_791667. 1	16	1050,86	1,34E-02	1,15E-02	1,57	0,81	DRM	DSM	PA14_4402 0	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit
YP_791669. 1	4	176,58	0,00E+0 0	2,00E-04	14,69	1,00	DRM	DSM	PA14_4405 0	succinate dehydrogenase (D subunit)
YP_791670. 1	6	632,55	1,00E-04	3,00E-04	5,13	1,00	DRM	DSM	PA14_4406 0	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit
YP_791692. 1	12	612,1	1,20E-03	1,90E-03	1,76	0,99	DRM	DSM	PA14_4430 0	aerotaxis receptor Aer
YP_791695. 1	3	248,6	0,00E+0 0	1,00E-04	5,07	1,00	DRM	DSM	PA14_4434 0	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I
YP_791696. 1	14	1086,84	4,00E-04	9,00E-04	3,19	1,00	DRM	DSM	PA14_4435 0	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II

YP_791697. 1	21	2163,26	1,00E-04	3,00E-04	5,18	1,00	DRM	DSM	PA14_4436 0	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III
YP_791698. 1	3	256,82	1,00E-04	3,00E-04	3,44	1,00	DRM	DSM	PA14_4437 0	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I
YP_791699. 1	7	726,89	1,00E-04	3,00E-04	6,21	1,00	DRM	DSM	PA14_4438 0	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II
YP_791700. 1	2	117,42	1,44E-02	1,22E-02	6,59	0,80	DRM	DSM	PA14_4439 0	cytochrome c oxidase subunit
YP_791701. 1	27	2531,71	4,00E-04	8,00E-04	2,46	1,00	DRM	DSM	PA14_4440 0	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III
YP_791703. 1	6	353,04	1,10E-03	1,80E-03	1,93	0,99	DRM	DSM	PA14_4443 0	hypothetical protein
YP_791704. 1	4	228,75	2,96E-02	2,15E-02	3,46	0,65	DRM	DSM	PA14_4444 0	cation-transporting P-type ATPase
YP_791725. 1	9	989,46	6,00E-04	1,20E-03	2,39	1,00	DRM	DSM	PA14_4467 0	cell division protein ZipA
YP_791740. 1	2	41,93	0,00E+0 0	2,00E-04	5,23	1,00	DRM	DSM	PA14_4488 0	hypothetical protein
YP_791770. 1	3	201,14	3,00E-04	7,00E-04	24,60	1,00	DRM	DSM	PA14_4526 0	hypothetical protein
YP_791771. 1	25	1777,78	0,00E+0 0	2,00E-04	5,13	1,00	DRM	DSM	PA14_4528 0	cytochrome c-type biogenesis protein
YP_791772. 1	2	106,59	1,58E-02	1,30E-02	3,21	0,78	DRM	DSM	PA14_4529 0	cytochrome C-type biogenesis protein CcmH
YP_791773. 1	7	532,31	1,00E-04	3,00E-04	5,25	1,00	DRM	DSM	PA14_4530 0	cytochrome C biogenesis protein CcmG
YP_791774. 1	6	305,84	5,00E-04	1,00E-03	4,56	1,00	DRM	DSM	PA14_4531 0	cytochrome C-type biogenesis protein CcmF
YP_791776. 1	2	73,88	4,20E-03	4,80E-03	7,90	0,95	DRM	DSM	PA14_4534 0	heme exporter protein
YP_791779. 1	2	75,9	2,93E-02	2,14E-02	1,78	0,66	DRM	DSM	PA14_4538 0	cytochrome c biogenesis protein CcmA
YP_791792. 1	4	324,12	0,00E+0 0	1,00E-04	7,69	1,00	DRM	DSM	PA14_4556 0	flagellar motor protein

YP_791795. 1	11	566,45	2,55E-02	1,93E-02	2,12	0,69	DRM	DSM	PA14_4561 0	chemotaxis protein CheZ
YP_791800. 1	2	114,68	1,16E-02	1,04E-02	17,52	0,83	DRM	DSM	PA14_4568 0	flagellar biosynthesis protein FlhA
YP_791806. 1	4	164,77	3,00E-04	7,00E-04	10,64	1,00	DRM	DSM	PA14_4577 0	flagellar biosynthesis protein FliP
YP_791810. 1	5	326,89	8,70E-03	8,40E-03	3,44	0,87	DRM	DSM	PA14_4581 0	flagellar basal body-associated protein FliL
YP_791823. 1	7	442,67	7,00E-04	1,30E-03	2,90	1,00	DRM	DSM	PA14_4597 0	cation-transporting P-type ATPase
YP_791843. 1	14	650,7	1,10E-02	1,00E-02	1,77	0,84	DRM	DSM	PA14_4624 0	hypothetical protein
YP_791904. 1	7	718,39	0,00E+0 0	2,00E-04	20,59	1,00	DRM	DSM	PA14_4692 0	ABC transporter permease
YP_791921. 1	10	564,27	8,00E-04	1,40E-03	9,13	1,00	DRM	DSM	PA14_4712 0	hypothetical protein
YP_791937. 1	3	320,79	6,00E-03	6,30E-03	17,12	0,92	DRM	DSM	PA14_4732 0	hypothetical protein
YP_791940. 1	2	145,16	7,00E-04	1,30E-03	11,37	1,00	DRM	DSM	PA14_4735 0	hypothetical protein
YP_791944. 1	3	228,7	1,60E-03	2,30E-03	7,26	0,99	DRM	DSM	PA14_4739 0	transmembrane sensor
YP_791952. 1	20	1729,65	0,00E+0 0	1,00E-04	5,50	1,00	DRM	DSM	PA14_4749 0	hypothetical protein
YP_791998. 1	8	362,92	1,90E-03	2,60E-03	1,68	0,98	DRM	DSM	PA14_4810 0	alkaline protease secretion protein AprE
YP_791999. 1	12	967,33	2,53E-02	1,92E-02	2,08	0,69	DRM	DSM	PA14_4811 5	alkaline protease secretion protein AprD
YP_792000. 1	6	198,05	5,70E-03	6,00E-03	4,07	0,92	DRM	DSM	PA14_4814 0	hypothetical protein
YP_792028. 1	4	219,8	3,00E-04	7,00E-04	6,71	1,00	DRM	DSM	PA14_4852 0	membrane-bound lytic murein transglycosylase A
YP_792052. 1	3	243,64	5,00E-04	1,00E-03	10,32	1,00	DRM	DSM	PA14_4880 0	hypothetical protein

YP_792086. 1	2	96,55	3,92E-02	2,70E-02	1,55	0,59	DRM	DSM	PA14_4917 0	two-component sensor PhoQ
YP_792148. 1	11	600,11	2,00E-04	5,00E-04	12,36	1,00	DRM	DSM	PA14_4990 0	hypothetical protein
YP_792168. 1	4	214,96	4,10E-03	4,70E-03	2,54	0,95	DRM	DSM	PA14_5014 0	flagellar MS-ring protein
YP_792205. 1	14	1158,14	0,00E+0 0	1,00E-04	7,83	1,00	DRM	DSM	PA14_5063 0	hypothetical protein
YP_792213. 1	3	224,3	3,60E-02	2,51E-02	1,73	0,61	DRM	DSM	PA14_5071 0	ShaD
YP_792235. 1	2	100,67	4,20E-03	4,80E-03	1,50	0,95	DRM	DSM	PA14_5094 0	hypothetical protein
YP_792238. 1	29	1743,57	0,00E+0 0	1,00E-04	3,52	1,00	DRM	DSM	PA14_5098 0	penicillin amidase
YP_792260. 1	17	1310,52	4,40E-03	4,90E-03	4,64	0,94	DRM	DSM	PA14_5126 0	hypothetical protein
YP_792264. 1	3	97,29	1,50E-03	2,20E-03	4,88	0,99	DRM	DSM	PA14_5130 0	hypothetical protein
YP_792301. 1	13	1637,12	6,80E-03	6,90E-03	5,49	0,90	DRM	DSM	PA14_5171 0	peptidoglycan associated lipoprotein OprL precursor
YP_792302. 1	38	3527,86	2,20E-03	2,90E-03	4,59	0,98	DRM	DSM	PA14_5172 0	translocation protein TolB
YP_792303. 1	9	701,01	0,00E+0 0	2,00E-04	4,30	1,00	DRM	DSM	PA14_5173 0	TolA protein
YP_792304. 1	12	743,91	0,00E+0 0	1,00E-04	14,46	1,00	DRM	DSM	PA14_5174 0	TolR protein
YP_792305. 1	12	1160,4	0,00E+0 0	0,00E+0 0	7,90	1,00	DRM	DSM	PA14_5175 0	TolQ protein
YP_792319. 1	6	435,05	9,00E-04	1,60E-03	3,37	1,00	DRM	DSM	PA14_5191 0	hypothetical protein
YP_792321. 1	4	271,21	0,00E+0 0	2,00E-04	3,87	1,00	DRM	DSM	PA14_5193 0	thioredoxin
YP_792329. 1	18	1681,55	0,00E+0 0	2,00E-04	25,56	1,00	DRM	DSM	PA14_5202 0	hypothetical protein

YP_792338. 1	14	714,51	2,14E-02	1,67E-02	1,55	0,72	DRM	DSM	PA14_5213 0	hypothetical protein
YP_792343. 1	2	49,03	1,02E-02	9,50E-03	2,21	0,85	DRM	DSM	PA14_5219 0	23S rRNA 5-methyluridine methyltransferase
YP_792348. 1	11	833,36	2,00E-04	6,00E-04	3,63	1,00	DRM	DSM	PA14_5226 0	sensor/response regulator hybrid
YP_792356. 1	5	152,49	1,80E-03	2,50E-03	2,63	0,99	DRM	DSM	PA14_5235 0	hypothetical protein
YP_792358. 1	2	156,65	6,00E-04	1,20E-03	4,04	1,00	DRM	DSM	PA14_5238 0	cytochrome b561
YP_792386. 1	2	120,27	3,00E-04	7,00E-04	11,30	1,00	DRM	DSM	PA14_5277 0	arginine/ornithine transport protein AotM
YP_792387. 1	3	46,62	7,40E-03	7,30E-03	10,14	0,89	DRM	DSM	PA14_5278 0	arginine/ornithine transport protein AotQ
YP_792409. 1	11	965,3	0,00E+0 0	1,00E-04	26,45	1,00	DRM	DSM	PA14_5304 0	lysozyme inhibitor
YP_792431. 1	2	140,44	1,70E-03	2,40E-03	2,97	0,99	DRM	DSM	PA14_5333 0	sulfate transport protein CysZ
YP_792436. 1	3	93,02	3,30E-03	4,00E-03	5,04	0,96	DRM	DSM	PA14_5339 0	hypothetical protein
YP_792501. 1	12	704,56	0,00E+0 0	1,00E-04	5,92	1,00	DRM	DSM	PA14_5415 0	sodium/proline symporter PutP
YP_792506. 1	3	269,99	0,00E+0 0	1,00E-04	8,84	1,00	DRM	DSM	PA14_5422 0	inhibitor of cysteine peptidase
YP_792515. 1	3	160,84	1,00E-04	3,00E-04	6,57	1,00	DRM	DSM	PA14_5434 0	hypothetical protein
YP_792516. 1	26	1381,08	0,00E+0 0	0,00E+0 0	13,10	1,00	DRM	DSM	PA14_5435 0	signal peptidase I
YP_792521. 1	5	524,82	1,22E-02	1,08E-02	9,33	0,82	DRM	DSM	PA14_5442 0	anti-sigma factor MucA
YP_792542. 1	2	128,12	3,30E-03	4,00E-03	4,78	0,96	DRM	DSM	PA14_5467 0	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
YP_792579. 1	17	1070,32	1,00E-04	4,00E-04	2,66	1,00	DRM	DSM	PA14_5508 0	hypothetical protein

YP_792630. 1	2	70,03	1,03E-02	9,50E-03	1,82	0,85	DRM	DSM	PA14_5569 0	exodeoxyribonuclease V subunit gamma
YP_792637. 1	4	252,4	1,00E-04	3,00E-04	2,34	1,00	DRM	DSM	PA14_5577 0	phosphate transporter
YP_792653. 1	15	1029,15	8,30E-03	8,10E-03	3,21	0,88	DRM	DSM	PA14_5598 0	hypothetical protein
YP_792654. 1	12	1037,04	3,95E-02	2,71E-02	2,23	0,59	DRM	DSM	PA14_5600 0	chemotactic transducer PctA
YP_792671. 1	2	89,18	9,50E-03	9,00E-03	2,84	0,86	DRM	DSM	PA14_5620 0	lipoprotein
YP_792703. 1	7	326,49	1,60E-03	2,40E-03	4,31	0,99	DRM	DSM	PA14_5668 0	ferrous iron transport protein B
YP_792705. 1	3	217,12	1,44E-02	1,22E-02	5,56	0,80	DRM	DSM	PA14_5670 0	hypothetical protein
YP_792707. 1	10	563,65	2,80E-03	3,50E-03	2,34	0,97	DRM	DSM	PA14_5673 0	hypothetical protein
YP_792714. 1	3	222,4	2,00E-03	2,70E-03	7,30	0,98	DRM	DSM	PA14_5681 0	lemA-like protein
YP_792715. 1	38	4023,2	0,00E+0 0	1,00E-04	22,50	1,00	DRM	DSM	PA14_5683 0	metalloproteinase outer membrane
YP_792716. 1	18	950,6	1,00E-04	3,00E-04	8,74	1,00	DRM	DSM	PA14_5684 0	hypothetical protein
YP_792717. 1	26	2155,62	0,00E+0 0	1,00E-04	19,38	1,00	DRM	DSM	PA14_5685 0	lipoprotein
YP_792740. 1	10	960,23	1,60E-03	2,30E-03	3,16	0,99	DRM	DSM	PA14_5711 0	hypothetical protein
YP_792758. 1	9	414,23	1,43E-02	1,21E-02	2,34	0,80	DRM	DSM	PA14_5734 0	UDPdiphospho- muramoylpentapeptide beta-N- acetylglucosaminyltransferase
YP_792769. 1	28	3058,32	0,00E+0 0	1,00E-04	17,44	1,00	DRM	DSM	PA14_5748 0	lipoprotein
YP_792772. 1	16	1490,66	0,00E+0 0	1,00E-04	10,09	1,00	DRM	DSM	PA14_5751 0	secreted lipoprotein

YP_792775. 1	23	1418,16	7,00E-04	1,20E-03	3,67	1,00	DRM	DSM	PA14_5754 0	cytochrome c1
YP_792776. 1	14	830,19	9,00E-04	1,50E-03	3,38	1,00	DRM	DSM	PA14_5756 0	cytochrome b
YP_792786. 1	13	1396,83	0,00E+0 0	1,00E-04	11,60	1,00	DRM	DSM	PA14_5769 0	hypothetical protein
YP_792791. 1	16	973,21	1,00E-04	3,00E-04	4,51	1,00	DRM	DSM	PA14_5776 0	AlgW protein
YP_792804. 1	5	401,06	2,31E-02	1,78E-02	2,20	0,71	DRM	DSM	PA14_5791 0	hypothetical protein
YP_792832. 1	3	321,06	0,00E+0 0	1,00E-04	25,45	1,00	DRM	DSM	PA14_5823 0	hypothetical protein
YP_792834. 1	41	2618,64	2,00E-04	7,00E-04	5,37	1,00	DRM	DSM	PA14_5825 0	hypothetical protein
YP_792836. 1	21	1360,01	0,00E+0 0	2,00E-04	10,61	1,00	DRM	DSM	PA14_5827 0	hypothetical protein
YP_792839. 1	5	168,14	1,80E-03	2,60E-03	2,27	0,99	DRM	DSM	PA14_5832 0	two-component sensor
YP_792848. 1	11	845,23	5,00E-04	1,00E-03	6,53	1,00	DRM	DSM	PA14_5844 0	dipeptide ABC transporter permease DppB
YP_792849. 1	6	308,46	3,00E-04	7,00E-04	3,69	1,00	DRM	DSM	PA14_5845 0	dipeptide ABC transporter permease DppC
YP_792858. 1	3	192,98	7,00E-04	1,30E-03	10,33	1,00	DRM	DSM	PA14_5856 0	oxidoreductase
YP_792865. 1	6	381,46	2,80E-03	3,50E-03	3,12	0,97	DRM	DSM	PA14_5865 0	chemotaxis transducer
YP_792866. 1	2	87,3	7,10E-03	7,10E-03	6,65	0,90	DRM	DSM	PA14_5866 0	hypothetical protein
YP_792871. 1	9	887,3	2,30E-03	3,00E-03	8,34	0,98	DRM	DSM	PA14_5873 0	type IV pilin structural subunit
YP_792875. 1	4	203,9	0,00E+0 0	1,00E-04	12,84	1,00	DRM	DSM	PA14_5877 0	type 4 prepilin peptidase PILD
YP_792919. 1	2	52,96	2,70E-03	3,40E-03	7,63	0,97	DRM	DSM	PA14_5923 0	colicin immunity protein

YP_793006. 1	20	1498,95	0,00E+0 0	1,00E-04	6,44	1,00	DRM	DSM	PA14_6023 0	competence protein ComL
YP_793011. 1	2	118,12	5,70E-03	6,00E-03	5,78	0,92	DRM	DSM	PA14_6028 0	type 4 fimbrial biogenesis protein FimU
YP_793012. 1	2	184,13	4,40E-03	5,00E-03	5,00	0,94	DRM	DSM	PA14_6029 0	type 4 fimbrial biogenesis protein PilW
YP_793038. 1	4	162,17	9,50E-03	9,00E-03	3,16	0,86	DRM	DSM	PA14_6058 0	hypothetical protein
YP_793065. 1	15	1207,15	7,00E-04	1,20E-03	3,29	1,00	DRM	DSM	PA14_6095 0	hypothetical protein
YP_793069. 1	2	114,97	0,00E+0 0	1,00E-04	35,54	1,00	DRM	DSM	PA14_6100 0	hypothetical protein
YP_793092. 1	5	268,26	1,61E-02	1,31E-02	1,57	0,78	DRM	DSM	PA14_6129 0	lipoprotein
YP_793102. 1	22	1420,47	2,67E-02	2,00E-02	3,01	0,68	DRM	DSM	PA14_6140 0	malate:quinone oxidoreductase
YP_793118. 1	5	396,69	1,50E-03	2,30E-03	3,77	0,99	DRM	DSM	PA14_6159 0	hypothetical protein
YP_793123. 1	11	1152,46	3,00E-04	8,00E-04	9,74	1,00	DRM	DSM	PA14_6165 0	Lipid A 3-O-deacylase
YP_793129. 1	24	1472,48	3,54E-02	2,48E-02	2,39	0,61	DRM	DSM	PA14_6172 0	hypothetical protein
YP_793130. 1	9	666,53	4,00E-04	9,00E-04	3,38	1,00	DRM	DSM	PA14_6174 0	outer membrane lipoprotein LoIB
YP_793151. 1	21	1331,93	1,20E-02	1,07E-02	2,09	0,83	DRM	DSM	PA14_6202 0	paraquat-inducible protein B-like protein
YP_793162. 1	9	758,63	1,00E-04	3,00E-04	10,49	1,00	DRM	DSM	PA14_6219 0	hypothetical protein
YP_793163. 1	13	596,14	1,41E-02	1,20E-02	2,78	0,80	DRM	DSM	PA14_6220 0	penicillin-binding protein 1B
YP_793168. 1	5	229,7	7,00E-04	1,30E-03	8,23	1,00	DRM	DSM	PA14_6227 0	hypothetical protein
YP_793169. 1	3	227,75	4,84E-02	3,19E-02	21,11	0,54	DRM	DSM	PA14_6228 0	hemin importer ATP-binding subunit

YP_793170. 1	3	241,08	9,00E-03	8,70E-03	2,67	0,87	DRM	DSM	PA14_6229 0	ABC transporter permease
YP_793176. 1	2	88,89	5,00E-04	1,00E-03	6,01	1,00	DRM	DSM	PA14_6238 0	hypothetical protein
YP_793182. 1	3	157,56	1,00E-04	4,00E-04	31,36	1,00	DRM	DSM	PA14_6244 0	transporter
YP_793189. 1	4	168,73	2,00E-04	6,00E-04	4,78	1,00	DRM	DSM	PA14_6253 0	two-component sensor CbrA
YP_793199. 1	37	2268,54	3,82E-02	2,63E-02	2,03	0,60	DRM	DSM	PA14_6265 0	hypothetical protein
YP_793211. 1	5	287,77	0,00E+0 0	1,00E-04	50,11	1,00	DRM	DSM	PA14_6281 0	preprotein translocase subunit SecG
YP_793215. 1	20	1556,3	4,50E-03	5,00E-03	5,44	0,94	DRM	DSM	PA14_6286 0	cell division protein FtsH
YP_793226. 1	11	866,39	3,00E-04	7,00E-04	5,36	1,00	DRM	DSM	PA14_6299 0	heat shock protein GrpE
YP_793229. 1	7	382,92	1,10E-03	1,80E-03	5,34	0,99	DRM	DSM	PA14_6303 0	outer membrane lipoprotein OmlA precursor
YP_793234. 1	3	166,31	9,00E-04	1,50E-03	4,40	1,00	DRM	DSM	PA14_6308 0	L-lactate permease
YP_793235. 1	18	955,59	6,00E-04	1,20E-03	2,97	1,00	DRM	DSM	PA14_6309 0	L-lactate dehydrogenase
YP_793236. 1	4	197,4	1,20E-03	1,80E-03	6,83	0,99	DRM	DSM	PA14_6310 0	ferredoxin
YP_793256. 1	3	154,2	1,90E-03	2,60E-03	4,05	0,99	DRM	DSM	PA14_6333 0	glycerolphosphodiesterase
YP_793257. 1	6	347,32	4,40E-03	5,00E-03	3,44	0,94	DRM	DSM	PA14_6334 0	lipoprotein
YP_793308. 1	16	1388,09	3,00E-04	7,00E-04	3,96	1,00	DRM	DSM	PA14_6403 0	hypothetical protein
YP_793311. 1	10	684,65	0,00E+0 0	2,00E-04	8,20	1,00	DRM	DSM	PA14_6408 0	thiol:disulfide interchange protein
YP_793317. 1	7	453,24	0,00E+0 0	2,00E-04	5,80	1,00	DRM	DSM	PA14_6417 0	hypothetical protein

YP_793322. 1	5	338,51	1,00E-03	1,70E-03	4,99	1,00	DRM	DSM	PA14_6423 0	RetS (regulator of exopolysaccharide and Type III secretion)
YP_793344. 1	11	858,36	3,00E-04	7,00E-04	3,90	1,00	DRM	DSM	PA14_6448 0	DNA-binding transcriptional activator OsmE
YP_793383. 1	15	743,03	1,04E-02	9,60E-03	1,61	0,85	DRM	DSM	PA14_6492 0	methyl-accepting chemotaxis protein
YP_793393. 1	2	168,12	5,00E-04	1,10E-03	4,32	1,00	DRM	DSM	PA14_6504 0	hypothetical protein
YP_793401. 1	2	114,97	1,46E-02	1,23E-02	2,42	0,79	DRM	DSM	PA14_6516 0	hypothetical protein
YP_793421. 1	17	993,5	4,20E-03	4,80E-03	3,78	0,95	DRM	DSM	PA14_6543 0	flagellar motor protein MotB
YP_793422. 1	7	391,83	7,00E-04	1,20E-03	2,93	1,00	DRM	DSM	PA14_6545 0	flagellar motor protein MotA
YP_793425. 1	4	300,85	6,00E-04	1,20E-03	1,81	1,00	DRM	DSM	PA14_6550 0	phosphatidylserine decarboxylase
YP_793426. 1	9	381,33	3,00E-04	8,00E-04	1,90	1,00	DRM	DSM	PA14_6552 0	hypothetical protein
YP_793429. 1	8	678,88	4,00E-04	9,00E-04	5,35	1,00	DRM	DSM	PA14_6557 0	hypothetical protein
YP_793431. 1	11	709,01	1,60E-03	2,40E-03	3,86	0,99	DRM	DSM	PA14_6559 0	hypothetical protein
YP_793432. 1	8	483,8	2,20E-03	3,00E-03	2,36	0,98	DRM	DSM	PA14_6560 5	DNA topoisomerase IV subunit A
YP_793434. 1	11	515,67	0,00E+0 0	1,00E-04	9,42	1,00	DRM	DSM	PA14_6564 0	hypothetical protein
YP_793440. 1	13	931,62	5,00E-04	1,00E-03	6,71	1,00	DRM	DSM	PA14_6572 0	lipoprotein
YP_793510. 1	4	233,06	0,00E+0 0	2,00E-04	6,33	1,00	DRM	DSM	PA14_6663 0	type 4 fimbrial biogenesis protein PilP
YP_793511. 1	9	668,49	0,00E+0 0	2,00E-04	3,75	1,00	DRM	DSM	PA14_6664 0	type 4 fimbrial biogenesis protein PilO

YP_793512. 1	7	374,36	1,10E-03	1,70E-03	3,94	1,00	DRM	DSM	PA14_6665 0	type 4 fimbrial biogenesis protein PilN
YP_793516. 1	17	1033,03	2,90E-03	3,60E-03	2,97	0,97	DRM	DSM	PA14_6669 0	protease
YP_793521. 1	2	77,39	1,00E-03	1,70E-03	15,84	1,00	DRM	DSM	PA14_6676 0	hypothetical protein
YP_793537. 1	4	272,84	0,00E+0 0	1,00E-04	7,34	1,00	DRM	DSM	PA14_6696 0	twin arginine translocase A
YP_793538. 1	2	75,28	2,30E-03	3,00E-03	3,91	0,98	DRM	DSM	PA14_6697 0	sec-independent translocase
YP_793539. 1	7	498,27	0,00E+0 0	1,00E-04	11,38	1,00	DRM	DSM	PA14_6698 0	sec-independent protein translocase TatC
YP_793541. 1	6	384,28	1,37E-02	1,17E-02	3,71	0,81	DRM	DSM	PA14_6701 0	chemotaxis transducer
YP_793544. 1	4	265,03	1,00E-03	1,60E-03	4,83	1,00	DRM	DSM	PA14_6704 0	ABC transporter permease
YP_793546. 1	15	1133,92	1,00E-04	3,00E-04	6,73	1,00	DRM	DSM	PA14_6706 5	glucosyltransferase MdoH
YP_793565. 1	3	289,92	1,55E-02	1,27E-02	6,71	0,78	DRM	DSM	PA14_6728 0	ABC transporter permease
YP_793577. 1	9	458,71	0,00E+0 0	1,00E-04	7,93	1,00	DRM	DSM	PA14_6745 0	outer membrane lipoprotein Blc
YP_793578. 1	2	94,05	3,00E-04	8,00E-04	5,50	1,00	DRM	DSM	PA14_6746 0	lipoprotein
YP_793582. 1	33	3171,09	0,00E+0 0	1,00E-04	10,80	1,00	DRM	DSM	PA14_6751 0	esterase EstA
YP_793583. 1	17	1165,63	0,00E+0 0	2,00E-04	10,60	1,00	DRM	DSM	PA14_6752 0	hypothetical protein
YP_793585. 1	7	451,98	7,50E-03	7,50E-03	2,32	0,89	DRM	DSM	PA14_6754 0	hypothetical protein
YP_793600. 1	5	160,37	0,00E+0 0	2,00E-04	6,70	1,00	DRM	DSM	PA14_6775 0	rhodanese-like domain-containing protein
YP_793618. 1	35	2169,91	1,00E-04	4,00E-04	5,25	1,00	DRM	DSM	PA14_6797 5	hypothetical protein

YP_793625. 1	4	189,78	3,00E-04	7,00E-04	5,88	1,00	DRM	DSM	PA14_6808 0	ABC transporter permease
YP_793626. 1	2	108,36	1,64E-02	1,34E-02	2,21	0,77	DRM	DSM	PA14_6809 0	ABC transporter permease
YP_793641. 1	9	615,07	0,00E+0 0	2,00E-04	3,82	1,00	DRM	DSM	PA14_6830 0	arginine/ornithine antiporter
YP_793666. 1	4	348,59	2,00E-04	7,00E-04	5,07	1,00	DRM	DSM	PA14_6862 0	hypothetical protein
YP_793693. 1	10	654,21	2,90E-03	3,60E-03	3,39	0,97	DRM	DSM	PA14_6895 5	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase
YP_793697. 1	3	87,34	3,12E-02	2,24E-02	2,43	0,64	DRM	DSM	PA14_6901 0	hypothetical protein
YP_793702. 1	2	107,53	4,00E-04	9,00E-04	3,30	1,00	DRM	DSM	PA14_6906 0	ABC transporter permease
YP_793703. 1	7	378,38	1,00E-04	3,00E-04	2,29	1,00	DRM	DSM	PA14_6907 0	ABC transporter ATP-binding protein/permease
YP_793704. 1	23	1940,5	2,30E-03	3,00E-03	2,73	0,98	DRM	DSM	PA14_6909 0	hypothetical protein
YP_793707. 1	7	456,3	1,00E-04	4,00E-04	6,81	1,00	DRM	DSM	PA14_6913 0	sn-glycerol-3-phosphate transporter
YP_793709. 1	8	397,88	2,30E-02	1,77E-02	2,47	0,71	DRM	DSM	PA14_6915 0	hypothetical protein
YP_793720. 1	2	70,35	1,50E-03	2,20E-03	13,59	0,99	DRM	DSM	PA14_6930 0	hypothetical protein
YP_793722. 1	4	186,78	1,00E-04	4,00E-04	11,50	1,00	DRM	DSM	PA14_6932 0	integral membrane transport protein
YP_793731. 1	20	1483,99	5,00E-04	1,10E-03	2,89	1,00	DRM	DSM	PA14_6943 0	hypothetical protein
YP_793742. 1	4	279,02	5,60E-03	5,90E-03	2,15	0,92	DRM	DSM	PA14_6957 0	magnesium/cobalt transport protein
YP_793765. 1	7	409,31	3,00E-04	7,00E-04	3,79	1,00	DRM	DSM	PA14_6985 0	choline transporter

YP_793778. 1	20	1335,74	8,90E-03	8,60E-03	2,57	0,87	DRM	DSM	PA14_7004 0	D-amino acid dehydrogenase small subunit
YP_793779. 1	2	172,76	2,85E-02	2,10E-02	6,15	0,66	DRM	DSM	PA14_7005 0	hypothetical protein
YP_793783. 1	14	789,54	0,00E+0 0	1,00E-04	6,55	1,00	DRM	DSM	PA14_7010 0	oxidoreductase
YP_793784. 1	10	587,56	0,00E+0 0	2,00E-04	12,40	1,00	DRM	DSM	PA14_7011 0	cardiolipin synthase
YP_793807. 1	2	160,6	7,10E-03	7,10E-03	4,06	0,90	DRM	DSM	PA14_7040 0	hypothetical protein
YP_793814. 1	5	384,45	6,00E-03	6,30E-03	3,45	0,92	DRM	DSM	PA14_7049 0	lipoprotein
YP_793846. 1	26	1919,99	3,00E-04	7,00E-04	2,41	1,00	DRM	DSM	PA14_7094 0	choline dehydrogenase
YP_793868. 1	4	145,26	1,30E-02	1,13E-02	2,40	0,81	DRM	DSM	PA14_7122 0	cardiolipin synthetase
YP_793889. 1	17	979,42	0,00E+0 0	1,00E-04	6,13	1,00	DRM	DSM	PA14_7145 0	hypothetical protein
YP_793943. 1	2	94,77	5,30E-03	5,70E-03	2,48	0,93	DRM	DSM	PA14_7214 0	hypothetical protein
YP_793955. 1	2	114,24	1,00E-04	4,00E-04	6,04	1,00	DRM	DSM	PA14_7232 0	hypothetical protein
YP_793962. 1	13	754,53	1,30E-03	2,00E-03	4,33	0,99	DRM	DSM	PA14_7240 0	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family protein
YP_793979. 1	4	329,82	1,70E-03	2,40E-03	2,58	0,99	DRM	DSM	PA14_7260 0	lipoprotein
YP_794006. 1	14	865,32	1,20E-03	1,90E-03	6,43	0,99	DRM	DSM	PA14_7293 0	hypothetical protein
YP_794036. 1	14	1355,36	0,00E+0 0	2,00E-04	5,80	1,00	DRM	DSM	PA14_7329 0	F0F1 ATP synthase subunit B
YP_794038. 1	5	528,32	0,00E+0 0	1,00E-04	10,50	1,00	DRM	DSM	PA14_7331 0	F0F1 ATP synthase subunit A
YP_794046. 1	22	1470,56	0,00E+0 0	1,00E-04	10,17	1,00	DRM	DSM	PA14_7341 0	inner membrane protein translocase component YidC

Références bibliographiques

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., García, F., & Manresa, A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir*, *17*(5), 1367-1371. <https://doi.org/10.1021/la0011735>
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(5), 1323-1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2014). A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. *Chemistry & Biology*, *21*(1), 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.010>
- Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G., & Schumacher, U. (s. d.). *Pseudomonas aeruginosa II Lectin Stops Human Ciliary Beating: Therapeutic Implications of Fucose p p*.
- Adam, Z., Zaltsman, A., Sinvany-Villalobo, G., & Sakamoto, W. (2005). FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*, *123*(4), 386-390. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00436.x>
- Adams, H., Teertstra, W., Demmers, J., Boesten, R., & Tommassen, J. (2003). Interactions between Phage-Shock Proteins in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *185*(4), 1174-1180. <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1174-1180.2003>
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M., & Tommassen, J. (2002). PspE (phage-shock protein E) of Escherichia coli is a rhodanese. *FEBS Letters*, *518*(1-3), 173-176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02695-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02695-9)
- Agrawal, V., & Kishan, K. V. (2003). OB-fold: Growing Bigger with Functional Consistency. *Current Protein and Peptide Science*, *4*(3), 195-206. <https://doi.org/10.2174/1389203033487207>
- Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., & Cervantes, C. (2006). Heavy metal resistance in pseudomonads. In *Pseudomonas* (Vol. 6, p. 255-282). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3909-5_9
- Aguirre-Ramírez, M., Medina, G., González-Valdez, A., Grosso-Becerra, V., & Soberón-Chávez, G. (2012). The Pseudomonas aeruginosa rmlBDAC operon, encoding dTDP-l-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor σ S. *Microbiology*, *158*(4), 908-916. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054726-0>
- Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H., & Ito, K. (1996). FtsH (HflB) Is an ATP-dependent Protease Selectively Acting on SecY and Some Other Membrane Proteins *. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(49), 31196-31201. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31196>
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Phipps, R. K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L. D., Van Gennip, M., Parsek, M., Hoiby, N., Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2009). Pseudomonas aeruginosa recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology*, *155*(11), 3500-3508. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031443-0>
- Alhede, M., Lorenz, M., Fritz, B. G., Jensen, P. Ø., Ring, H. C., Bay, L., & Bjarnsholt, T. (2020). Bacterial aggregate size determines phagocytosis efficiency of polymorphonuclear leukocytes. *Medical Microbiology and Immunology*, *209*(6), 669-680. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00691-1>

- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, *59*(4), 1114-1128. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.05008.X>
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* : Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), 3262-3268.
- Andrade, S. S., Jones, R. N., Gales, A. C., & Sader, H. S. (2003). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres : 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001) [2]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(1), 140-141. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg270>
- Applegate, D. H., & Bryers, J. D. (1991). Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering*, *37*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1002/bit.260370105>
- Aravin, A. A., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. *Science*, *318*(5851), 761-764. <https://doi.org/10.1126/science.1146484>
- Arcus, V. (2002). OB-fold domains : A snapshot of the evolution of sequence, structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, *12*(6), 794-801. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00392-5)
- Aseeva, E., Ossenbühl, F., Eichacker, L. A., Wanner, G., Soll, J., & Vothknecht, U. C. (2004). Complex Formation of Vipp1 Depends on Its α -Helical PspA-like Domain *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(34), 35535-35541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401750200>
- Aspedon, A., Palmer, K., & Whiteley, M. (2006). Microarray Analysis of the Osmotic Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(7), 2721-2725. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2721-2725.2006>
- Azghani, A. O., & Peterson, B. (2000). *Virulence Factors from Pseudomonas aeruginosa Increase Lung Epithelial Permeability*. <https://doi.org/10.1007/s004080000031>
- Babuke, T., & Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology*, *86*(9), 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.03.003>
- Bach, J. N., & Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, *88*(6), 1205-1217. <https://doi.org/10.1111/mmi.12252>
- Bahl, S., Dolma, J., Jyot Singh, J., & Sehgal, S. (2021). Biodegradation of plastics : A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*, *39*, 31-34. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.096>
- Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D. W., & Stevens, T. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Y-Mediated Tau Hyperphosphorylation Impairs Microtubule Assembly in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. *PLOS ONE*, *8*(9), e74343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074343>
- Baldwin, D. S. (2001). Depression and sexual dysfunction. *British Medical Bulletin*, *57*, 81-99. <https://doi.org/10.1093/bmb/57.1.81>

- Bally, M., Ball, G., Badere, A., & Lazdunski, A. (s. d.). *Protein Secretion in Pseudomonas aeruginosa: The xcpA Gene Encodes an Integral Inner Membrane Protein Homologous to Klebsiella pneumoniae Secretion Function Protein PulO* (Vol. 173, Numéro 2). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Banerji, S., & Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: A new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology*, *150*(3), 522-525. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26957-0>
- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R., & Harwood, C. S. (2012). 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 Research*, *40*(15), 7207-7218. <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>
- Bardoel, B. W., van der Ent, S., Pel, M. J. C., Tommassen, J., Pieterse, C. M. J., van Kessel, K. P. M., & van Strijp, J. A. G. (2011). *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathogens*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002206>
- Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S.-H., Rice, S. A., Kjelleberg, S., & Webb, J. S. (2006). Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(21), 7344-7353. <https://doi.org/10.1128/JB.00779-06>
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2009). Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *Journal of Bacteriology*, *191*(23), 7333-7342. <https://doi.org/10.1128/JB.00975-09>
- Barrow, K., & Kwon, D. H. (2009). Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5150-5154. <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09/FORMAT/EPUB>
- Bartolome, A., Boskovic, S., Paunovic, I., Bozic, V., & Cvejic, D. (2016). Stomatin-like protein 2 overexpression in papillary thyroid carcinoma is significantly associated with high-risk clinicopathological parameters and BRAFV600E mutation. *APMIS*, *124*(4), 271-277. <https://doi.org/10.1111/apm.12505>
- Barton, A. D., Ryder, K., Lourenço, R. V., Dralle, W., & Weiss, S. G. (1976). Inflammatory reaction and airway damage in cystic fibrosis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *88*(3), 423-426.
- Basta, D. W., Angeles-Albores, D., Spero, M. A., Cierniecki, J. A., & Newman, D. K. (2020). Heat-shock proteases promote survival of *Pseudomonas aeruginosa* during growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(8), 4358-4367. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912082117>
- Basu Roy, A., & Sauer, K. (2014). Diguanylate cyclase NicD-based signalling mechanism of nutrient-induced dispersion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *94*(4), 771-793. <https://doi.org/10.1111/mmi.12802>
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L. L., Studholme, D. J., Yeats, C., & Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, *32*(suppl_1), D138-D141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh121>
- 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.*
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.029>
- Beaufort, N., Corvazier, E., Mlanaoindrou, S., de Bentzmann, S., & Pidard, D. (2013). *Disruption of the Endothelial Barrier by Proteases from the Bacterial Pathogen Pseudomonas aeruginosa: Implication of Matrilysin and Receptor Cleavage.*
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075708>
- Beaussart, A., Baker, A. E., Kuchma, S. L., El-Kirat-Chatel, S., O'toole, G. A., & Dufré, Y. F. (2014). *Nanoscale Adhesion Forces of Pseudomonas aeruginosa Type IV Pili.*
<https://doi.org/10.1021/nn5044383>
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., & Ghigo, J.-M. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, 51(3), 659-674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>
- Ben Mlouka, M. A. (2014). *Caractérisation du système BAC impliqué dans la formation de biofilms chez Pseudomonas aeruginosa* [These de doctorat, Rouen].
<https://www.theses.fr/2014ROUES051>
- Bergstrom, J. D., Kurtz, M. M., Rew, D. J., Amend, A. M., Karkas, J. D., Bostedor, R. G., Bansal, V. S., Dufresne, C., VanMiddlesworth, F. L., Hensens, O. D., Liesch, J. M., Zink, D. L., Wilson, K. E., Onishi, J., Milligan, J. A., Bills, G., Kaplan, L., Omstead, M. N., Jenkins, R. G., ... Alberts, A. W. (1993). Zaragozic Acids: A Family of Fungal Metabolites that are Picomolar Competitive Inhibitors of Squalene Synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(1), 80-84.
- Bergström, S., Theorell, H., & Davide, H. (1946, juillet 13). *Pyolipic acid, a metabolic product of Pseudomonas pyocyanea, active against Mycobacterium tuberculosis.*
<https://www.semanticscholar.org/paper/Pyolipic-acid%2C-a-metabolic-product-of-Pseudomonas-Bergstr%C3%B6m-Theorell/fdff368707a4307fc3f21bf600ee3ef3c79431fa>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bernal-Cabas, M., Miethke, M., Antelo-Varela, M., Aguilar Suárez, R., Neef, J., Schön, L., Gabarrini, G., Otto, A., Becher, D., Wolf, D., & van Dijl, J. M. (2020). Functional association of the stress-responsive LiaH protein and the minimal TatAyCy protein translocase in Bacillus subtilis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(8), 118719. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118719>
- Bernstein, H. D. (2019). Type V Secretion in Gram-Negative Bacteria. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0031-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0031-2018>
- Bever, R. A., & Iglewski, B. H. (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa elastase structural gene. *Journal of bacteriology*, 170(9), 4309-4314. <https://doi.org/10.1128/JB.170.9.4309-4314.1988>
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793-13802. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Biofilm Development.* (s. d.). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014>

- Blackman, L. D., Gunatillake, P. A., Cass, P., & Locock, K. E. S. (2019). An introduction to zwitterionic polymer behavior and applications in solution and at surfaces. *Chemical Society Reviews*, *48*(3), 757-770. <https://doi.org/10.1039/C8CS00508G>
- Blackman, L. D., Qu, Y., Cass, P., & Locock, K. E. S. (2021). Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. *Chemical Society Reviews*, *50*(3), 1587-1616. <https://doi.org/10.1039/D0CS00986E>
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.-C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S., & Schneider, M. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 365-370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg095>
- Boehm, M., Nield, J., Zhang, P., Aro, E.-M., Komenda, J., & Nixon, P. J. (2009). Structural and Mutational Analysis of Band 7 Proteins in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, *191*(20), 6425-6435. <https://doi.org/10.1128/jb.00644-09>
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, *57*(5), 1210-1223. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04743.X>
- 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. *Molecular Microbiology*, *75*(4), 827-842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>
- Boulant, E., Davin-Regli, A., Pagès, J.-M., & Bolla, J.-M. (2020). Les pompes d'efflux, mécanisme de résistance bactérien. *Revue Francophone des Laboratoires*, *2020*(519), 38-49. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(20\)30061-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30061-7)
- Bowling, F. Z., Frohman, M. A., & Airola, M. V. (2021). Structure and regulation of human phospholipase D. *Advances in Biological Regulation*, *79*, 100783. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100783>
- Boyd, A., & Chakrabarty, A. M. (s. d.). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. <https://academic.oup.com/jimb/article/15/3/162/5988543>
- Boyd, A., & Chakrabarty, A. M. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(7), 2355-2359.
- Bramkamp, M., & Lopez, D. (2015). Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(1), 81-100. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00036-14>
- Brand, J., Smith, E. S. J., Schwefel, D., Lapatsina, L., Poole, K., Omerbašić, D., Kozlenkov, A., Behlke, J., Lewin, G. R., & Daumke, O. (2012). A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. *The EMBO Journal*, *31*(17), 3635-3646. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.203>
- Braun, P., De Groot, A., Bitter, W., & Tommassen, J. (1998). Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *180*(13), 3467-3469. <https://doi.org/10.1128/JB.180.13.3467-3469.1998/FORMAT/EPUB>
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W., & Tommassen, J. (2001). Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase FORMATION OF THE DISULFIDE

- BONDS*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 26030-26035.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M007122200>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320-330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 313-334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>
- Brencic, A., & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology*, 72(3), 612-632. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06670.X>
- Brissette, J. L., Russel, M., Weiner, L., & Model, P. (1990). Phage Shock Protein, a Stress Protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), 862-866.
- Brissette, J. L., Weiner, L., Ripmaster, T. L., & Model, P. (1991). Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of Molecular Biology*, 220(1), 35-48. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90379-K](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90379-K)
- Brown, D. A. (2002). Isolation and Use of Rafts. *Current Protocols in Immunology*, 51(1), 11.10.1-11.10.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1110s51>
- 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 and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 59-66. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.04.036>
- Bucior, I., Pielage, J. F., & Engel, J. N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. *PLoS Pathog*, 8(4), 1002616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002616>
- Bultema, J. B., Fuhrmann, E., Boekema, E. J., & Schneider, D. (2010). Vipp1 and PspA. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2), 162-165. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10529>
- Bunt, C. R., Jones, D. S., & Tucker, I. G. (1993). The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *International Journal of Pharmaceutics*, 99, 93.
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 493-520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Burstein, D., Satanower, S., Simovitch, M., Belnik, Y., Zehavi, M., Yerushalmi, G., Ben-Aroya, S., Pupko, T., & Banin, E. (2015). Novel Type III Effectors in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 6(2), 10.1128/mbio.00161-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00161-15>
- Busalmen, J. P., Vázquez, M., & De Sánchez, S. R. (2002). New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. *Electrochimica Acta*, 47(12), 1857-1865. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(01\)00899-4](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(01)00899-4)
- Butcher, B. G., & Helmann, J. D. (2006). Identification of *Bacillus subtilis* σ^W -dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by

- Bacilli. *Molecular Microbiology*, 60(3), 765-782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05131.x>
- 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. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622-638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., & O'Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7351-7361. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005>
- Cain, A. K., Nolan, L. M., Sullivan, G. J., Whitchurch, C. B., Filloux, A., & Parkhill, J. (2019). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PAK. *Microbiology Resource Announcements*, 8(41). <https://doi.org/10.1128/MRA.00865-19/FORMAT/EPUB>
- Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., & Häussler, S. (2015). LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. *Infection and Immunity*, 84(1), 162-171. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15>
- Cassin, E. K., & Tseng, B. S. (2019). Pushing beyond the Envelope: The Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 201(18), 10.1128/jb.00050-19. <https://doi.org/10.1128/jb.00050-19>
- Cattoir, V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52(10), 607-616. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.001>
- Catucci, L., Depalo, N., Lattanzio, V. M. T., Agostiano, A., & Corcelli, A. (2004). Neosynthesis of Cardiolipin in *Rhodobacter sphaeroides* under Osmotic Stress. *Biochemistry*, 43(47), 15066-15072. <https://doi.org/10.1021/bi048802k>
- Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (2022). Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: A chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, 24(6), 2630-2656. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- Chambers, J. R., & Sauer, K. (2013). Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 21(1), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.008>
- Chamsaz, E. A., Mankoci, S., Barton, H. A., & Joy, A. (2017). Nontoxic Cationic Coumarin Polyester Coatings Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(8), 6704-6711. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b12610>
- Chauhan, A., Bernardin, A., Mussard, W., Kriegel, I., Estève, M., Ghigo, J.-M., Beloin, C., & Semetey, V. (2014). Preventing Biofilm Formation and Associated Occlusion by Biomimetic Glycocalyxlike Polymer in Central Venous Catheters. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(9), 1347-1356. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu249>
- Chayabutra, C., Wu, J., & Ju, L.-K. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 25-33. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010105\)72:1<25::AID-BIT4>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010105)72:1<25::AID-BIT4>3.0.CO;2-J)

- Chen, Y., Yu, P., Luo, J., & Jiang, Y. (2003). Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT. *Mammalian Genome*, *14*(12), 859-865. <https://doi.org/10.1007/s00335-003-2296-6>
- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R. W., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D. P., Van Saene, H., & Hart, C. A. (1996). Spread of β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet*, *348*(9028), 639-642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)05169-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05169-0)
- Cherny, K. E., & Sauer, K. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Requires the DNA-Specific Endonuclease EndA To Degrade Extracellular Genomic DNA To Disperse from the Biofilm. *Journal of Bacteriology*, *201*(18), e00059-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00059-19>
- Cherny, K. E., & Sauer, K. (2020). Untethering and Degradation of the Polysaccharide Matrix Are Essential Steps in the Dispersion Response of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *202*(3), e00575-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00575-19>
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J., Frohman, M. A., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J., & Frohman, M. A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology*, *8*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ncb1487>
- Choi, Y., Park, H.-Y., Park, S. J., Park, S.-J., Kim, S.-K., Ha, C., Im, S.-J., & Lee, J.-H. (2011). Growth Phase-Differential Quorum Sensing Regulation of Anthranilate Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cells*, *32*, 57-65. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
- Choudhury, D., Talukdar, A. D., Choudhury, M. D., Maurya, A. P., Paul, D., Chanda, D. D., Chakravorty, A., & Bhattacharjee, A. (2015). Transcriptional Analysis of MexAB-OprM Efflux Pumps System of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Role in Carbapenem Resistance in a Tertiary Referral Hospital in India. *PLOS ONE*, *10*(7), e0133842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133842>
- Chowdhury, I., Thompson, W. E., & Thomas, K. (2014). Prohibitins Role in Cellular Survival Through Ras-Raf-MEK-ERK Pathway. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(8), 998-1004. <https://doi.org/10.1002/jcp.24531>
- Christie, D. A., Lemke, C. D., Elias, I. M., Chau, L. A., Kirchhof, M. G., Li, B., Ball, E. H., Dunn, S. D., Hatch, G. M., & Madrenas, J. (2011). Stomatin-Like Protein 2 Binds Cardiolipin and Regulates Mitochondrial Biogenesis and Function. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(18), 3845-3856. <https://doi.org/10.1128/MCB.05393-11>
- Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., & Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature Communications*, *5*(1), 4462. <https://doi.org/10.1038/ncomms5462>
- Cianciotto, N. P., & White, R. C. (2017). Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. *Infection and Immunity*, *85*(5). <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-17/FORMAT/EPUB>
- Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J., & López-Boado, Y. S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and Alginate Elicit Very Distinct Gene Expression Patterns in Airway Epithelial Cells: Implications for Cystic Fibrosis Disease. *The Journal of Immunology*, *173*(9), 5659-5670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5659>
- Comolli, J. C., Waite, L. L., Mostov, K. E., & Engel, J. N. (1999). Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas*

- aeruginosa. *Infection and Immunity*, *67*(7), 3207-3214.
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.7.3207-3214.1999/FORMAT/EPUB>
- Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, E. C., Kempself, K. E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J. E., Davies, D. E., & Cappello, F. (2016). *Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438>
- Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial Extracellular Polymeric Substances : Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Cowell, B. A., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. J. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiology Letters*, *250*(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.044>
- Cross, A. R., & Goldberg, J. B. (2019). Remodeling of O Antigen in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* via Transcriptional Repression of *wzz2*. *mBio*, *10*(1), e02914-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02914-18>
- Czolkoss, S., Safronov, X., Rexroth, S., Knoke, L. R., Aktas, M., & Narberhaus, F. (2021). *Agrobacterium tumefaciens* Type IV and Type VI Secretion Systems Reside in Detergent-Resistant Membranes. *Frontiers in Microbiology*, *12*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754486>
- Dadashi, M., Chen, L., Nasimian, A., Ghavami, S., & Duan, K. (2021). Putative RNA Ligase RtcB Affects the Switch between T6SS and T3SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22), Article 22.
<https://doi.org/10.3390/ijms222212561>
- Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., & von Heijne, G. (2005). Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5726), 1321-1323. <https://doi.org/10.1126/science.1109730>
- Damron, F. H., & Yu, H. D. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity. *Journal of Bacteriology*, *193*(1), 286-291. <https://doi.org/10.1128/JB.01132-10>
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., & Pesci, E. C. (2002). Autolysis and Autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* Colony Morphology Mutants. *Journal of Bacteriology*, *184*(23), 6481-6489. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6481-6489.2002>
- Darouiche, R. O. (2004). Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *New England Journal of Medicine*, *350*(14), 1422-1429.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra035415>
- Darwin, A. J. (2007). Regulation of the Phage-Shock-Protein Stress Response in *Yersinia enterocolitica*. In R. D. Perry & J. D. Fetherston (Éds.), *The Genus Yersinia* (Vol. 603, p. 167-177). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72124-8_14
- Darwin, A. J., & Miller, V. L. (1999). Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*, *32*(1), 51-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01324.x>
- Das, M. C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U. C., Tribedi, P., Akhter, Y., Bhattacharjee, S., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U. C., Tribedi, P., Akhter, Y., & Bhattacharjee, S. (2016). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

- formation by Vitexin : A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep23347>
- Datta, P., Ravi, J., Guerrini, V., Chauhan, R., Neiditch, M. B., Shell, S. S., Fortune, S. M., Hancioglu, B., Igoshin, O. A., & Gennaro, M. L. (2015). The Psp system of *Mycobacterium tuberculosis* integrates envelope stress-sensing and envelope-preserving functions. *Molecular Microbiology*, 97(3), 408-422. <https://doi.org/10.1111/mmi.13037>
- Daumke, O., & Lewin, G. R. (2022). SPFH protein cage—One ring to rule them all. *Cell Research*, 32(2), 117-118. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00605-7>
- Dautin, N., & Bernstein, H. D. (2007). Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 89-112. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093233>
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1027-1036. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003>
- David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., & Sternberg, M. J. E. (2022). The AlphaFold Database of Protein Structures : A Biologist's Guide. *Journal of Molecular Biology*, 434(2), 167336. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167336>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, 12(1), 9-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10/FORMAT/EPUB>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 74(3), 1092-2172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davis, G., & Thornalley, P. J. (1983). Free radical production from the aerobic oxidation of reduced pyridine nucleotides catalysed by phenazine derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 724(3), 456-464. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(83\)90106-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90106-8)
- De Araújo Padilha, C. E., Da Costa Nogueira, C., De Santana Souza, D. F., De Oliveira, J. A., & Dos Santos, E. S. (2019). Valorization of green coconut fibre : Use of the black liquor of organosolv pretreatment for ethanol production and the washing water for production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. *Industrial Crops and Products*, 140, 111604. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111604>
- De Sousa, J. R., Da Costa Correia, J. A., De Almeida, J. G. L., Rodrigues, S., Pessoa, O. D. L., Melo, V. M. M., & Gonçalves, L. R. B. (2011). Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry*, 46(9), 1831-1839. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.016>
- De Sousa, T., Hébraud, M., N Enes Dapkevici, M. L., Maltez, L., Eduardo Pereira, J., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., Poeta, P., & N Enes Dapkevicius, M. L. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Dean, P. (2011). Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(6), 1100-1125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00271.x>

- DeAngelis, C. M., Nag, D., Withey, J. H., & Matson, J. S. (2019). Characterization of the *Vibrio cholerae* Phage Shock Protein Response. *Journal of Bacteriology*, *201*(14), 10.1128/jb.00761-18. <https://doi.org/10.1128/jb.00761-18>
- Deep, A., Chaudhary, U., & Gupta, V. (2011). Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity : From Molecules to Disease. *Journal of Laboratory Physicians*, *3*(01), 004-011. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.78553>
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1694*(1-3 SPEC.ISS.), 149-161. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2004.05.001>
- Deligianni, E., Pattison, S., Berrar, D., Ternan, N. G., Haylock, R. W., Moore, J. E., Elborn, S. J., & Dooley, J. S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/38>
- DeLisa, M. P., Lee, P., Palmer, T., & Georgiou, G. (2004). Phage Shock Protein PspA of *Escherichia coli* Relieves Saturation of Protein Export via the Tat Pathway. *Journal of Bacteriology*, *186*(2), 366-373. <https://doi.org/10.1128/jb.186.2.366-373.2004>
- Dempwolff, F., Möller, H. M., & Graumann, P. L. (2012). Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *Journal of Bacteriology*, *194*(17), 4652-4661. <https://doi.org/10.1128/JB.00910-12>
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1440*(2-3), 244-252. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00129-8)
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., & Villemur, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1485*(2-3), 145-152. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00039-1)
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., & Bisailon, J. (1996). Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(6), 1908-1912.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., & Winzer, K. (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *8*(6), 1095-1104. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x>
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology*, *50*(1), 29-43. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03672.X>
- Doig, P., Todd, T., Sastry, P. A., Lee, K. K., Hodges, R. S., Paranchych, W., & Irvin, R. T. (1988). Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity*, *56*(6), 1641-1646. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.6.1641-1646.1988>
- Domínguez-Escobar, J., Wolf, D., Fritz, G., Höfler, C., Wedlich-Söldner, R., & Mascher, T. (2014). Subcellular localization, interactions and dynamics of the phage-shock

- protein-like Lia response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 92(4), 716-732. <https://doi.org/10.1111/mmi.12586>
- 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*. *Communicative & Integrative Biology*, 1(1), 88-96.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms : Microbial Life on Surfaces. In *Emerging Infectious Diseases* • (Vol. 8, Numéro 9). <http://www.microbelibrary.org/>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Donovan, C., & Bramkamp, M. (s. d.). *Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025312-0>
- D'Souza-Ault, M. R., Smith, L. T., & Smith, G. M. (1993). Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 473-478. <https://doi.org/10.1128/aem.59.2.473-478.1993>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps : Structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., & Lépine, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology*, 9(1), 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-263>
- Duong, F., Bonnet, E., Âli, V. G., Lazdunski, A. Â., Murgier, M., & Filloux, A. (s. d.). *The AprX protein of Pseudomonas aeruginosa : A new substrate for the Apr type I secretion system*. www.elsevier.com/locate/gene
- Dworkin, J., Jovanovic, G., & Model, P. (2000). The PspA Protein of *Escherichia coli* Is a Negative Regulator of σ 54-Dependent Transcription. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 311-319. <https://doi.org/10.1128/jb.182.2.311-319.2000>
- Edwards, J. R., & Hayashi, J. A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111(2), 415-421. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90204-3)
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M., & Buck, M. (2005). Molecular Determinants for PspA-Mediated Repression of the AAA Transcriptional Activator PspF. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3238-3248. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3238-3248.2005>
- Engl, C., Jovanovic, G., Lloyd, L. J., Murray, H., Spitaler, M., Ying, L., Errington, J., & Buck, M. (2009). In vivo localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 73(3), 382-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06776.x>
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., & Hinton, J. C. D. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1), 103-118. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>
- Erzberger, J. P., & Berger, J. M. (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35, 93-114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933>

- Eslami, P., Hajfarajollah, H., & Bazsefidpar, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, *10*(56), 34014-34032. <https://doi.org/10.1039/D0RA04953K>
- Evans, S. A., Turner, S. M., Bosch, B. J., Hardy, C. C., & Woodhead, M. A. (1996). Lung function in bronchiectasis: The influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Respiratory Journal*, *9*(8), 1601-1604. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09081601>
- Everett, M. J., & Davies, D. T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, *26*(9), 2108-2123. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.02.026>
- Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M. G., Ellert, N. W., Irvin, R. T., Sherburne, R., & Paranchych, W. (1994). Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. *Infection and Immunity*, *62*(10), 4118-4123. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.10.4118-4123.1994>
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., & Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *147*(10), 2659-2669. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>
- Feola, D. J., Garvy, B. A., Cory, T. J., Birket, S. E., Hoy, H., Hayes, D., & Murphy, B. S. (2010). Azithromycin Alters Macrophage Phenotype and Pulmonary Compartmentalization during Lung Infection with *Pseudomonas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(6), 2437-2447. <https://doi.org/10.1128/AAC.01424-09>
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(12), 6212-6222. <https://doi.org/10.1128/AAC.01530-12/FORMAT/EPUB>
- Ferrara, S., Rossi, A., Ranucci, S., De Fino, I., Bragonzi, A., Cigana, C., & Bertoni, G. (2020). *The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity in Airway Infections* Downloaded from. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00909-20>
- Finck-Barbançon, V., Yahr, T. L., & Frank, D. W. (1998). Identification and Characterization of SpcU, a Chaperone Required for Efficient Secretion of the ExoU Cytotoxin. *Journal of Bacteriology*, *180*(23), 6224-6231. <https://doi.org/10.1128/jb.180.23.6224-6231.1998>
- Finkel, S. E., & Kolter, R. (2001). DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. *Journal of Bacteriology*, *183*(21), 6288-6293. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001>
- Flemming, H. (2008). Biofilms. In John Wiley & Sons, Ltd (Éd.), *eLS* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000342.pub2>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

- Flores-Kim, J., & Darwin, A. J. (2016). The Phage Shock Protein Response. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 83-101. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095359>
- Floret, N., Bertrand, X., Thouverez, M., & Talon, D. (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : Origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*, 57(1), 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.011>
- Folders, J., Tommassen, J., Van Loon, L. C., & Bitter, W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1257-1263. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1257-1263.2000/FORMAT/EPUB>
- Foster, J. S., & Kolenbrander, P. E. (2004). Development of a Multispecies Oral Bacterial Community in a Saliva-Conditioned Flow Cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4340-4348. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4340-4348.2004>
- Frank, D. W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 26(4), 621-629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6251991.x>
- Fraser, G. M., & Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), 630-635. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00033-8)
- Friedman, L., & Kolter, R. (2004a). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(3), 675-690. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>
- Friedman, L., & Kolter, R. (2004b). Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4457-4465. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4457-4465.2004>
- Fuhrmann, E., Bultema, J. B., Kahmann, U., Rupprecht, E., Boekema, E. J., & Schneider, D. (2009). The vesicle-inducing protein 1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 organizes into diverse higher-ordered ring structures. *Molecular Biology of the Cell*, 20(21), 4620-4628. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0319>
- Galdino, A. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., & Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases : Weapons to battle the host. In *Pathophysiological Aspects of Proteases* (p. 381-397). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16
- García-Fernández, E., Koch, G., Wagner, R. M., Fekete, A., Stengel, S. T., Schneider, J., Mielich-Süss, B., Geibel, S., Markert, S. M., Stigloher, C., & Lopez, D. (2017). Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance. *Cell*, 171(6), 1354-1367.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.012>
- Gasser, V., Baco, E., Cunrath, O., August, P. S., Perraud, Q., Zill, N., Schleberger, C., Schmidt, A., Paulen, A., Bumann, D., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2016). Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa* : An opportunity for siderophore-antibiotic conjugates development. *Environmental Microbiology*, 18(3), 819-832. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13199>
- Gates, S. N., & Martin, A. (2020). Stairway to translocation : AAA+ motor structures reveal the mechanisms of ATP-dependent substrate translocation. *Protein Science*, 29(2), 407-419. <https://doi.org/10.1002/pro.3743>
- Gawande, P. V., Leung, K. P., & Madhyastha, S. (2014). Antibiofilm and Antimicrobial Efficacy of DispersinB®-KSL-W Peptide-Based Wound Gel Against Chronic Wound

- Infection Associated Bacteria. *Current Microbiology*, 68(5), 635-641.
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0519-6>
- Gehl, B., & Sweetlove, L. J. (2014). Mitochondrial Band-7 family proteins : Scaffolds for respiratory chain assembly? *Frontiers in Plant Science*, 5.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00141>
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173.
<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouillot, S., Elsen, S., Lemaire, D., Skoufias, D. A., Huber, P., Attree, I., & Dessen, A. (2012). Structural Basis of Cytotoxicity Mediated by the Type III Secretion Toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002637. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002637>
- Genin, S., & Boucher, C. A. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria : Modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Molecular & General Genetics: MGG*, 243(1), 112-118.
<https://doi.org/10.1007/BF00283883>
- Gessard, C. (1984). On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(Supplement_3), S775-S776.
https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement_3.S775
- Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants : An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106429>
- Giltner, C. L., Van Schaik, E. J., Audette, G. F., Kao, D., Hodges, R. S., Hassett, D. J., & Irvin, R. T. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1083-1096. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.05002.X>
- Gimenez, M. R., Chandra, G., Van Overvelt, P., Voulhoux, R., Bleves, S., & Ize, B. (2018). Genome wide identification and experimental validation of *Pseudomonas aeruginosa* Tat substrates. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30393-x>
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L., & Tolker-Nielsen, T. (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms : Genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular Microbiology*, 75(4), 815-826.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06793.x>
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*, 7(6), 894-904. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00775.x>
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T., & Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1819-1833.
<https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1819>
- Glick, R., Gilmour, C., Tremblay, J., Satanower, S., Avidan, O., Déziel, E., Greenberg, E. P., Poole, K., & Banin, E. (2010). Increase in Rhamnolipid Synthesis under Iron-Limiting Conditions Influences Surface Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2973-2980.
<https://doi.org/10.1128/JB.01601-09>

- Goldflam, M., & Rowe, J. J. (1983). Evidence for gene sharing in the nitrate reduction systems of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *155*(3), 1446-1449.
- Goli, H. R., Nahaei, M. R., Rezaee, M. A., Hasani, A., Kafil, H. S., Aghazadeh, M., Nikbakht, M., & Khalili, Y. (2018). Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(3), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.016>
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Elsen, S., Attrée, I., & Huber, P. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLOS Pathogens*, *12*(1), e1005377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005377>
- Goltermann, L., & Tolker-Nielsen, T. (2017). Importance of the Exopolysaccharide Matrix in Antimicrobial Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(4), e02696-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02696-16>
- Gómez-Lozano, M., Marvig, R. L., Molina-Santiago, C., Tribelli, P. M., Ramos, J.-L., & Molin, S. (2015). Diversity of small RNAs expressed in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports*, *7*(2), 227-236. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12233>
- Goodacre, N. F., Gerloff, D. L., & Uetz, P. (2013). Protein Domains of Unknown Function Are Essential in Bacteria. *mBio*, *5*(1), e00744-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00744-13>
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & Development*, *23*(2), 249-259. <https://doi.org/10.1101/gad.1739009>
- Grande, K. K., Gustin, J. K., Kessler, E., & Ohman, D. E. (2007). Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. *Journal of Bacteriology*, *189*(11), 3960-3968. <https://doi.org/10.1128/JB.01828-06/FORMAT/EPUB>
- Green, J. B., Fricke, B., Chetty, M. C., von Düring, M., Preston, G. F., & Stewart, G. W. (2004). Eukaryotic and prokaryotic stomatins: The proteolytic link. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *32*(3), 411-422. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2004.01.016>
- Guerra, P., González-Alamos, M., Llauro, A., Casañas, A., Querol-Audí, J., de Pablo, P. J., & Verdaguer, N. (2022). Symmetry disruption commits vault particles to disassembly. *Science Advances*, *8*(6), eabj7795. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj7795>
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S., & Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(11), 2568-2573. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>
- Gunther, N. W., Nuñez, A., Fett, W., & Solaiman, D. K. Y. (2005). Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2288-2293. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2288-2293.2005>
- Guo, Y.-P., Hu, Y.-Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of Colloid and Interface Science*, *331*(2), 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.039>

- Gupta, T. K., Klumpe, S., Gries, K., Heinz, S., Wietrzynski, W., Ohnishi, N., Niemeyer, J., Spaniol, B., Schaffer, M., Rast, A., Ostermeier, M., Strauss, M., Pitzko, J. M., Baumeister, W., Rudack, T., Sakamoto, W., Nickelsen, J., Schuller, J. M., Schroda, M., & Engel, B. D. (2021). Structural basis for VIPP1 oligomerization and maintenance of thylakoid membrane integrity. *Cell*, *184*(14), 3643-3659.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.011>
- Güvener, Z. T., & Harwood, C. S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular microbiology*, *66*(6), 1459-1473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x>
- Guzmán-Flores, J. E., Steinemann-Hernández, L., De La Vara, L. E. G., Gavilanes-Ruiz, M., Romeo, T., Alvarez, A. F., & Georgellis, D. (2019). Proteomic analysis of *Escherichia coli* detergent-resistant membranes (DRM). *PLoS ONE*, *14*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223794>
- Guzzo, J., Pages, J.-M., Duong, F., Lazdunski, A., & Murgierl, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease : Evidence for Secretion Genes and Study of Secretion Mechanism. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 173, Numéro 17, p. 5290-5297). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014a). Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, *1149*, 67-72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_8
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014b). Plate-Based assay for swimming motility in *pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, *1149*, 59-65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7
- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology*, *2*, 1242-1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>
- Hakko, K. (s. d.). Seiga Itoh, Haruo Honda, Fusao Tomita and Takeo Suzuki. *THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, *12*.
- Hamann, L., Alexander, C., Stamme, C., Zähringer, U., & Schumann, R. R. (2005). Acute-Phase Concentrations of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Inhibit Innate Immune Cell Activation by Different LPS Chemotypes via Different Mechanisms. *Infection and Immunity*, *73*(1), 193-200. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.193-200.2005>
- Hancock, R. E. W., & Brinkman, F. S. L. (2002). Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 17-38. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160310>
- Hankamer, B. D., Elderkin, S. L., Buck, M., & Nield, J. (2004). Organization of the AAA+ Adaptor Protein PspA Is an Oligomeric Ring*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8862-8866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307889200>
- Hanson, P. I., & Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: Have engine, will work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(7), 519-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1684>
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, J., & Tolker-Nielsen, T. (s. d.). *An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>

- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* : Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654-665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Hauser, A. R., Fleiszig, S., Kang, P. J., Mostov, K., & Engel, J. N. (1998). Defects in Type III Secretion Correlate with Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 66(4), 1413-1420. <https://doi.org/10.1128/iai.66.4.1413-1420.1998>
- Hauser, G., & Karnovsky, M. L. (1954). STUDIES ON THE PRODUCTION OF GLYCOLIPIDE BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *Journal of Bacteriology*, 68(6), 645-654. <https://doi.org/10.1128/jb.68.6.645-654.1954>
- Hay, I. D., Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2009). MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1110-1120. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-08>
- Hay, T., Fraud, S., Lau, C. H.-F., Gilmour, C., & Poole, K. (2013). Antibiotic inducibility of the mexXY multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa* : Involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. *PloS One*, 8(2), e56858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056858>
- Hazarika, P., Dham, N., Patel, P., Cho, M., Weidner, D., Goldsmith, L., & Duvic, M. (1999). Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(1), 147-159. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19991001\)75:1<147::AID-JCB15>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19991001)75:1<147::AID-JCB15>3.0.CO;2-D)
- He, J., Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M., & Rahme, L. G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2530-2535. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0304622101>
- Heber, S., & Tropp, B. E. (1991). Genetic regulation of cardiolipin synthase in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1129(1), 1-12. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90206-2](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90206-2)
- Heidrich, J., Thurotte, A., & Schneider, D. (2017). Specific interaction of IM30/Vipp1 with cyanobacterial and chloroplast membranes results in membrane remodeling and eventually in membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(4), 537-549. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.025>
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V Protein Secretion Pathway : The Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 692-744. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.4.692-744.2004>
- Hennig, R., Heidrich, J., Saur, M., Schmäuser, L., Roeters, S. J., Hellmann, N., Woutersen, S., Bonn, M., Weidner, T., Markl, J., & Schneider, D. (2015). IM30 triggers membrane fusion in cyanobacteria and chloroplasts. *Nature Communications*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms8018>
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with

- hypermutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4062-4070.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00148-07/FORMAT/EPUB>
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial Surface Translocation : A Survey and a Classification. In *BACTERIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 36, Numéro 4, p. 478-503).
<https://journals.asm.org/journal/br>
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300-1307. <https://doi.org/10.1172/JCI200320074>
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-87>
- Herman, D. C., Zhang, Y., & Miller, R. M. (1997). Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3622-3627.
- Heywood, A., & Lamont, I. L. (2020). Cell envelope proteases and peptidases of *Pseudomonas aeruginosa* : Multiple roles, multiple mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 857-873. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa036>
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F., Harwood, C. S., & Greenberg, E. P. (2005). *A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507170102
- Hinderhofer, M., Walker, C. A., Friemel, A., Stuermer, C. A., Möller, H. M., & Reuter, A. (2009). Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-10>
- Hindré, T., Brüggemann, H., Buchrieser, C., & Héchard, Y. (2008). Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology*, 154(1), 30-41. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008698-0>
- Hirai, K., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S., & Mitsuhashi, S. (1987). Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(4), 582-586. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.4.582>
- Hiraoka, S., Matsuzaki, H., & Shibuya, I. (1993). Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 336(2), 221-224. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80807-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80807-7)
- Hirayama, T., & Kato, I. (1982). Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*, 139(1), 81-85. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80492-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80492-4)
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix : An overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), 649-669. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- Hoe, C. H., Raabe, C. A., Rozhdestvensky, T. S., & Tang, T. H. (2013). Bacterial sRNAs : Regulation in stress. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(5), 217-229. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.002>
- Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T. B., Song, Z., Johansen, H. K., Givskov, M., & Høiby, N. (2007). Azithromycin Blocks Quorum Sensing and Alginate Polymer Formation and Increases the Sensitivity to Serum and Stationary-Growth-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa* and Attenuates Chronic *P. aeruginosa* Lung Infection in

- Cfr-/- Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(10), 3677-3687.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01011-06>
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., & Williams, C. (2015). ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*, S1-S25.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- Holguín, A. V., Rangel, G., Clavijo, V., Prada, C., Mantilla, M., Catalina Gomez, M., Kutter, E., Taylor, C., Fineran, P. C., Fernando González Barrios, A., & Vives, M. J. (2015). Phage Pan70, a Putative Temperate Phage, Controls *Pseudomonas aeruginosa* in Planktonic, Biofilm and Burn Mouse Model Assays. *Viruses*, *7*, 4602-4623.
<https://doi.org/10.3390/v7082835>
- Holland, I. B., Schmitt, L., & Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Molecular Membrane Biology*, *22*(1-2), 29-39.
<https://doi.org/10.1080/09687860500042013>
- Holmqvist, E., & Wagner, G. H. (2017). Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochemical Society Transactions*, *45*(6), 1203-1212.
<https://doi.org/10.1042/BST20160363>
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., Silverman, J. M., Ohlson, B. B., Hicks, K. G., Plemel, R. L., Li, M., Schwarz, S., Wang, W. Y., Merz, A. J., Goodlett, D. R., & Mougous, J. D. (2010). A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host & Microbe*, *7*(1), 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.007>
- Hoon Jeong, S., Corresponding Author, A., Jin Hong, D., Kwon Bae, I., Jang, I.-H., Kang, H.-K., & Lee, K. (2015). *Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, *327*(5962), 167-170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(6), 365-379.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.40>
- Hoyle, B. D., Alcantara, J., & Costerton, J. W. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *36*(9), 2054-2056.
- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A. J., & Frohman, M. A. (2011). piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Developmental Cell*, *20*(3), 376-387. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.004>
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., & Wingreen, N. S. (2006). A Curvature-Mediated Mechanism for Localization of Lipids to Bacterial Poles. *PLoS Computational Biology*, *2*(11), e151. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020151>
- Huang, M., Gu, G., Ferguson, E. L., & Chalfie, M. (1995). A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature*, *378*(6554), Article 6554.
<https://doi.org/10.1038/378292a0>

- Huangyutitham, V., Güvener, Z. T., & Harwood, C. S. (2013). Subcellular Clustering of the Phosphorylated WspR Response Regulator Protein Stimulates Its Diguanylate Cyclase Activity. *mBio*, *4*(3), e00242-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00242-13>
- Hulbert, D. E., Pasloske, W. C., Joffe, B. L., Volpel, A. M., Trebilcock, K., & Paranchych, M. K. (1990). The Role of Polar Pili in the Adherence of *Pseudomonas Aeruginosa* to Injured Canine Tracheal Cells: A Semiquantitative Morphologic Study. In *Scanning Microscopy* (Vol. 5, Numéro 1). <https://digitalcommons.usu.edu/microscopyAvailableat:https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol5/iss1/11>
- Hunt, B. E., Weber, A., Berger, A., Ramsey, B., & Smith, A. L. (1995). Macromolecular mechanisms of sputum inhibition of tobramycin activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(1), 34-39.
- Hurley, J. H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*, *34*(19), 2398-2407. <https://doi.org/10.15252/embj.201592484>
- Hutton, M. L., D'Costa, K., Rossiter, A. E., Wang, L., Turner, L., Steer, D. L., Masters, S. L., Croker, B. A., Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2017). A *Helicobacter pylori* Homolog of Eukaryotic Flotillin Is Involved in Cholesterol Accumulation, Epithelial Cell Responses and Host Colonization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00219>
- Ipsaro, J. J., Haase, A. D., Knott, S. R., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, *491*(7423), Article 7423. <https://doi.org/10.1038/nature11502>
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(50), 20632-20636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217993109>
- Irie, Y., O'Toole, G. A., & Yuk, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, *250*(2), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.012>
- 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. *Molecular Microbiology*, *78*(1), 158-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x>
- Ishimoto, K. S., & Lory, S. (1989). Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(6), 1954-1957.
- Iwański, B. I., Mizerska-Kowalska, M., & Andrejko, M. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *197*, 107884. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884>
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, *146*(1-2), 11-31. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>
- 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. *Journal of Bacteriology*, *186*(14), 4466-4475. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004>

- Janssen, K. H., Diaz, M. R., Golden, M., Graham, J. W., Sanders, W., Wolfgang, M. C., & Yahr, T. L. (2018). *Functional Analyses of the RsmY and RsmZ Small Noncoding Regulatory RNAs in Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1128/JB>
- Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, *71*(12), 4124-4126. <https://doi.org/10.1021/ja01180a073>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(36), 11353-11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., & Høiby, N. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *153*(5), 1329-1338. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0>
- Jeon, J., & Yong, D. (2019). *Two Novel Bacteriophages Improve Survival in Galleria mellonella Infection and Mouse Acute Pneumonia Models Infected with Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02900-18>
- Jessop, M., Felix, J., & Gutsche, I. (2021). AAA+ ATPases: Structural insertions under the magnifying glass. *Current Opinion in Structural Biology*, *66*, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.10.027>
- Ji, Y. C., Sifri, C. D., Goumnerov, B. C., Rahme, L. G., Ausubel, F. M., & Calderwood, S. B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *Journal of Bacteriology*, *184*(4), 952-961. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.952-961.2002/FORMAT/EPUB>
- Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., & Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host & Microbe*, *15*(5), 600-610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>
- Johansson, E. M. V., Crusz, S. A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R. U., Cacciarini, M., Bartels, K.-M., Diggle, S. P., Cámara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Darbre, T., & Reymond, J.-L. (2008). Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB. *Chemistry & Biology*, *15*(12), 1249-1257. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.10.009>
- Johnson, M. D. L., Garrett, C. K., Bond, J. E., Coggan, K. A., & Wolfgang, M. C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 Binds Integrin in an RGD-and Calcium-Dependent Manner. *PLoS ONE*, *6*(12), 29629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029629>
- Joly, N., Burrows, P. C., Engl, C., Jovanovic, G., & Buck, M. (2009). A Lower-Order Oligomer Form of Phage Shock Protein A (PspA) Stably Associates with the Hexameric AAA+ Transcription Activator Protein PspF for Negative Regulation. *Journal of Molecular Biology*, *394*(4), 764-775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.055>
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J. D., & Mascher, T. (2006). Regulation of LiaRS-Dependent Gene Expression in *Bacillus subtilis*: Identification of Inhibitor Proteins, Regulator Binding Sites, and Target Genes of a Conserved Cell Envelope Stress-Sensing Two-

- Component System. *Journal of Bacteriology*, *188*(14), 5153-5166.
<https://doi.org/10.1128/jb.00310-06>
- Jovanovic, G., Lloyd, L. J., Stumpf, M. P. H., Mayhew, A. J., Buck, M., Lloyd, L. J., Stumpf, M. P. H., Mayhew, A. J., & Buck, M. (2006). Induction and Function of the Phage Shock Protein Extracytoplasmic Stress Response in *Escherichia coli**. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(30), 21147-21161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602323200>
- Jovanovic, G., Mehta, P., McDonald, C., Davidson, A. C., Uzdavinys, P., Ying, L., & Buck, M. (2014). The N-Terminal Amphipathic Helices Determine Regulatory and Effector Functions of Phage Shock Protein A (PspA) in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *426*(7), 1498-1511. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.016>
- Jovanovic, G., Mehta, P., Ying, L., & Buck, M. (2014). Anionic lipids and the cytoskeletal proteins MreB and RodZ define the spatio-temporal distribution and function of membrane stress controller PspA in *Escherichia coli*. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*, 2374-2386. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078527-0>
- Jovanovic, G., Weiner, L., & Model, P. (1996). Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of Bacteriology*, *178*(7), 1936-1945.
<https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1936-1945.1996>
- J.S. Lam, H.L. Rocchetta, & L.L. Burrows. (1999). Glycosyltransferases of *Pseudomonas aeruginosa* that assemble the O antigens of A band and B band lipopolysaccharide. *Journal of Endotoxin Research*, *5*, 96-101.
- Juan, C., Maciá, M. D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(11), 4733-4738. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005/FORMAT/EPUB>
- Junglas, B., Huber, S. T., Heidler, T., Schlösser, L., Mann, D., Hennig, R., Clarke, M., Hellmann, N., Schneider, D., & Sachse, C. (2021). PspA adopts an ESCRT-III-like fold and remodels bacterial membranes. *Cell*, *184*(14), 3674-3688.e18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.042>
- Junglas, B., Orru, R., Axt, A., Siebenaller, C., Steinchen, W., Heidrich, J., Hellmich, U. A., Hellmann, N., Wolf, E., Weber, S. A. L., Schneider, D., Orru, R., Axt, A., Siebenaller, C., Steinchen, W., Heidrich, J., Hellmich, U. A., Hellmann, N., Wolf, E., ... Schneider, D. (2020). IM30 IDPs form a membrane-protective carpet upon super-complex disassembly. *Communications Biology*, *3*(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01314-4>
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—The Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl_2), W429-W432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>
- Kamal, S. M., Rybtke, M. L., Nimitz, M., Sperlein, S., Giske, C., Trček, J., Deschamps, J., Briandet, R., Dini, L., Jänsch, L., Tolker-Nielsen, T., Lee, C., & Römling, U. (2019). Two FtsH Proteases Contribute to Fitness and Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Clone C Strains. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1372.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01372>
- Kao, C. Y., Chen, S. S., Hung, K. H., Wu, H. M., Hsueh, P. R., Yan, J. J., & Wu, J. J. (2016). Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-

- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0719-2>
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal. *Journal of Dental Research*, *89*(3), 205-218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous β -Hexosaminidase Activity. *Journal of Bacteriology*, *185*(16), 4693-4698. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4693-4698.2003>
- Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., & Ardekani, A. M. (2015). Interplay of Physical Mechanisms and Biofilm Processes: Review of Microfluidic Methods. *Lab on a chip*, *15*(1), 23-42. <https://doi.org/10.1039/c4lc01095g>
- Karsten Baumgart, A. M., Molinari, M. A., & de Oliveira Silveira, A. C. (2010). Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in highcomplexity hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *14*(5), 433-436. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(10\)70089-1](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(10)70089-1)
- Katsikogianni, M., Missirlis, Y. F., Harris, L., & Douglas, J. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*, *8*, 37-57. <https://doi.org/10.22203/eCM.v008a05>
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., & Matsumoto, K. (2004). Cardiolipin Domains in *Bacillus subtilis* Marburg Membranes. *Journal of Bacteriology*, *186*(5), 1475-1483. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1475-1483.2004>
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., & Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(16), 6026-6033. <https://doi.org/10.1128/JB.00409-06>
- Kessler, E., Safrin, M., Gustin, J. K., & Ohman, D. E. (1998). Elastase and the LasA Protease of *Pseudomonas aeruginosa* Are Secreted with Their Propeptides*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 30225-30231. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30225>
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(10), 7503-7508. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53203-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53203-8)
- Kessler, E., SAFRIN Maurice, M., & Goldschleger, G. (1988). Synthesis, processing and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Journal of Bacteriology*, *170*(11), 5241-5247. <https://doi.org/10.1128/JB.170.11.5241-5247.1988>
- Ketko, A. K., Lin, C., Moore, B. B., & Levine, A. M. (2013). *Surfactant Protein A Binds Flagellin Enhancing Phagocytosis and IL-1 β Production*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082680>
- Khatri, I. A., Bhaskar, K. R., Lamont, J. T., Sajjan, S. U., Ho, C. K. Y., & Forstner, J. (2003). Effect of Chondroitinase ABC on Purulent Sputum from Cystic Fibrosis and Other Patients. *Pediatric Research*, *53*(4), 619-627. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000054780.11755.B9>
- Khil, P. P., & Camerini-Otero, R. D. (2002). Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *44*(1), 89-105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02878.x>

- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., & Kuwano, K. (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cellular Microbiology*, *10*(7), 1491-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>
- Kim, S.-K., & Lee, J.-H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, *54*(2), 71-85. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>
- 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. *Molecular Microbiology*, *50*(1), 61-68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x>
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1511-1524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>
- Kleerebezem, M., Crielgaard, W., & Tommassen, J. (1996). Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *The EMBO Journal*, *15*(1), 162-171. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00344.x>
- Klipp, R. C., Cullinan, M. M., & Bankston, J. R. (2020). Insights into the molecular mechanisms underlying the inhibition of acid-sensing ion channel 3 gating by stomatin. *Journal of General Physiology*, *152*(3), e201912471. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912471>
- Kobayashi, R., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2007). *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Molecular Microbiology*, *66*(1), 100-109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05893.x>
- Koch, G., Wermser, C., Acosta, I. C., Kricks, L., Stengel, S. T., Yepes, A., & Lopez, D. (2017). Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence by Targeting Flotillin Protein Scaffold Activity. *Cell Chemical Biology*, *24*(7), 845-857.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.027>
- Koch, H. U., Haas, R., & Fischer, W. (1984). The role of lipoteichoic acid biosynthesis in membrane lipid metabolism of growing *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*, *138*(2), 357-363. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb07923.x>
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, *182*(21), 5990-5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000/FORMAT/EPUB>
- Komatsu, T., Matsui, I., & Yokoyama, H. (2022). Structural and mutational studies suggest key residues to determine whether stomatin SPFH domains form dimers or trimers. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *32*, 101384. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101384>
- Koonin, E. (1996). A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *21*(7), 242-243. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(96\)30024-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(96)30024-8)
- Kroken, A. R., Kumar, N. G., Yahr, T. L., Smith, B. E., Nieto, V., Horneman, H., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. J. (2022). Exotoxin S secreted by internalized *Pseudomonas*

- aeruginosa delays lytic host cell death. *PLOS Pathogens*, *18*(2), e1010306. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010306>
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J., & Westhoff, P. (2001). VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(7), 4238-4242. <https://doi.org/10.1073/pnas.061500998>
- Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., & Dickerson, A. K. (2021). Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science*, *288*, 102336. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336>
- Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B. E., Jeffries, J. L., Ohman, D. E., & Lau, G. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase provides an Escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS ONE*, *6*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027091>
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W., & Lory, S. (2006). Acquisition and Evolution of the *exoU* Locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 4037-4050. <https://doi.org/10.1128/jb.02000-05>
- Kuwahara, Y., Ohno, A., Morii, T., Yokoyama, H., Matsui, I., Tochio, H., Shirakawa, M., & Hiroaki, H. (2008). The solution structure of the C-terminal domain of NfeD reveals a novel membrane-anchored OB-fold. *Protein Science*, *17*(11), 1915-1924. <https://doi.org/10.1110/ps.034736.108>
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, *188*(1), 386-393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>
- Lam, M. Y. C., McGroarty, E. J., Kropinski, A. M., MacDonald, L. A., Pedersen, S. S., Hoiby, N., & Lam, J. S. (1989). Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, *27*(5), 962-967. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.5.962-967.1989>
- Lamers, R. P., Nguyen, U. T., Nguyen, Y., Buensuceso, R. N. C., & Burrows, L. L. (2015). Loss of membrane-bound lytic transglycosylases increases outer membrane permeability and β -lactam sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, *4*(6), 879-895. <https://doi.org/10.1002/mbo3.286>
- Lan, L., & Shi, H. (2022). New insights into the formation and recovery of sublethally injured *Escherichia coli* O157:H7 induced by lactic acid. *Food Microbiology*, *102*, 103918. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103918>
- Landry, D. L., Braden, G. L., Gobeille, S. L., Haessler, S. D., Vaidya, C. K., & Sweet, S. J. (2010). Emergence of Gentamicin-Resistant Bacteremia in Hemodialysis Patients Receiving Gentamicin Lock Catheter Prophylaxis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, *5*(10), 1799-1804. <https://doi.org/10.2215/CJN.01270210>
- Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., Wiechers, M. F., Plattner, H., & Stuermer, C. A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *Journal of Neurobiology*, *37*(4), 502-523. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199812\)37:4<502::aid-neu2>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4<502::aid-neu2>3.0.co;2-s)

- Langer, P. J., Shanabruch, W. G., & Walker, G. C. (1981). Functional organization of plasmid pKM101. *Journal of Bacteriology*, *145*(3), 1310-1316. <https://doi.org/10.1128/jb.145.3.1310-1316.1981>
- Langhorst, M. F., Reuter, A., & Stuermer, C. a. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond : The function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *62*(19-20), 2228-2240. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5166-4>
- Langklotz, S., Schäkermann, M., & Narberhaus, F. (2011). Control of Lipopolysaccharide Biosynthesis by FtsH-Mediated Proteolysis of LpxC Is Conserved in Enterobacteria but Not in All Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, *193*(5), 1090-1097. <https://doi.org/10.1128/JB.01043-10>
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Göttlinger, H. G., & Weissenhorn, W. (2008). Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science*, *321*(5894), 1354-1357. <https://doi.org/10.1126/science.1161070>
- 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.*
- Lebeaux, D., & Ghigo, J.-M. (2012). Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *médecine/sciences*, *28*(8-9), 727-739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, *7*(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>
- Lee, J., & Zhang, L. (s. d.). *The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa.* <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, J.-Y., Park, Y. K., Chung, E. S., Young, I., Kwan, N. &, & Ko, S. (2016). Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Publishing Group.* <https://doi.org/10.1038/srep25543>
- Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Lory, S. (2007a). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, *65*(6), 1474-1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>
- Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Lory, S. (2007b). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, *65*(6), 1474-1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>
- Lee, W., Cornelis, P., Hellewell, P. G., B Lucy Allen, M. K., Dockrell, D. H., & Pattery, T. (2005). *Defenses In Vivo and Impairs Neutrophil-Mediated Host Induces Neutrophil Apoptosis aeruginosa Pseudomonas Pyocyanin Production by.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3643>
- Lee, Y. H., Kingston, A. W., & Helmann, J. D. (2012). Glutamate dehydrogenase affects resistance to cell wall antibiotics in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *194*(5), 993-1001. <https://doi.org/10.1128/JB.06547-11>
- Lei, W., Krolla, P., Schwartz, T., & Levkin, P. A. (2020). Controlling Geometry and Flow Through Bacterial Bridges on Patterned Lubricant-Infused Surfaces (pLIS). *Small*, *16*(52), 2004575. <https://doi.org/10.1002/smll.202004575>

- Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S., & Hough, E. (2000). The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure*, *8*(6), 655-667. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00150-7)
- Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., & Villemur, R. (2002). Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of Mass Spectrometry*, *37*(1), 41-46. <https://doi.org/10.1002/JMS.244>
- Létoffé, S., Redeker, V., & Wandersman, C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular Microbiology*, *28*(6), 1223-1234. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.00885.X>
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2012). SMART 7: Recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue), D302-305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr931>
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(4), 999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001/FORMAT/EPUB>
- Li, H., Kaneko, Y., & Keegstra, K. (1994). Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. *Plant Molecular Biology*, *25*(4), 619-632. <https://doi.org/10.1007/BF00029601>
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, *302*(2), 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Li, L., Huang, D., Cheung, M. K., Nong, W., Huang, Q., & Kwan, H. S. (2013). BSRD: A repository for bacterial small regulatory RNA. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D233-D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1264>
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 337-418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K., & Frankenberg-Dinkel, N. (2013). NO-Induced Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by an MHYT Domain-Coupled Phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology*, *195*(16), 3531-3542. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-12>
- Liang-Takasaki, C. J., Mäkelä, P. H., & Leive, L. (1982). Phagocytosis of bacteria by macrophages: Changing the carbohydrate of lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. *The Journal of Immunology*, *128*(3), 1229-1235. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.128.3.1229>
- Liao, J., Schurr, M. J., & Sauera, K. (2013). The merR-like regulator brlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, *195*(15), 3352-3363. <https://doi.org/10.1128/JB.00318-13/FORMAT/EPUB>
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., & Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(8), 2833-2838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511100103>

- Lindhout, T., Lau, P. C. Y., Brewer, D., & Lam, J. S. (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, *155*(10), 3449-3460. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030510-0>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(4), 582-610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09/FORMAT/EPUB>
- Liu, C., Willmund, F., Golecki, J. R., Cacace, S., Heß, B., Markert, C., & Schroda, M. (2007). The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, *50*(2), 265-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03047.x>
- Liu, J., Tassinari, M., Souza, D. P., Naskar, S., Noel, J. K., Bohuszewicz, O., Buck, M., Williams, T. A., Baum, B., & Low, H. H. (2021). Bacterial Vipp1 and PspA are members of the ancient ESCRT-III membrane-remodeling superfamily. *Cell*, *184*(14), 3660-3673.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.041>
- Llamas, M. A., Ramos, J. L., & Rodríguez-Herva, J. J. (2003). Transcriptional Organization of the *Pseudomonas putida* tol-oprL Genes. *Journal of Bacteriology*, *185*(1), 184-195. <https://doi.org/10.1128/jb.185.1.184-195.2003>
- Lloyd, L. J., Jones, S. E., Jovanovic, G., Gyaneshwar, P., Rolfe, M. D., Thompson, A., Hinton, J. C., & Buck, M. (2004). Identification of a New Member of the Phage Shock Protein Response in *Escherichia coli*, the Phage Shock Protein G (PspG) * [boxs]. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(53), 55707-55714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408994200>
- López, D., & Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes & Development*, *24*(17), 1893-1902. <https://doi.org/10.1101/gad.1945010>
- Lu, P., Wang, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Thompson, K. M., & Chen, S. (2016). RpoS-dependent sRNA RgsA regulates Fis and AcpP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *102*(2), 244-259. <https://doi.org/10.1111/mmi.13458>
- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C. D., & Yu, J. (2005). Transcriptional Adaptation of *Shigella flexneri* during Infection of Macrophages and Epithelial Cells: Insights into the Strategies of a Cytosolic Bacterial Pathogen. *Infection and Immunity*, *73*(1), 88-102. <https://doi.org/10.1128/iai.73.1.88-102.2005>
- Ma, C., Wang, C., Luo, D., Yan, L., Yang, W., Li, N., & Gao, N. (2022). Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins. *Cell Research*, *32*(2), 176-189. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00598-3>
- Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *Journal of Bacteriology*, *188*(23), 8213-8221. <https://doi.org/10.1128/jb.01202-06>
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G.-A., & Jouenne, T. (2008). Identification of Biofilm-Associated Cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Biofilm Formation and Virulence. *PLoS ONE*, *3*(12), e3897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003897>
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., O'Toole, G. A., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for

- Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), Article 6964. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7)
- Makin, S. A., & Beveridge, T. J. (1996). *The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa to surfaces*. 142, 299-307.
- Malet, J. K., Hennemann, L. C., Hua, E. M.-L., Faure, E., Waters, V., Rousseau, S., & Nguyen, D. (2022). A Model of Intracellular Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Airway Epithelial Cells. *Cellular Microbiology*, 2022, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2022/5431666>
- Manganelli, R., Cioetto-Mazzabò, L., Segafreddo, G., Boldrin, F., Sorze, D., Conflitti, M., Serafini, A., & Provvedi, R. (2023). SigE: A master regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1075143>
- Manganelli, R., & Gennaro, M. L. (2017). Protecting from Envelope Stress: Variations on the Phage-Shock-Protein Theme. *Trends in Microbiology*, 25(3), 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.10.001>
- Mann, E. E., & Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 893-916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>
- Martinez, J. L., Xu, L., Schurr, M. J., Wolf, P., & Michalska, M. (2015). *Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing*. 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>
- Martínez, L. C., Vadyvaloo, V., Lathem, W. W., & Allen, P. G. (2014). *Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00038>
- Mascher, T., Margulis, N. G., Wang, T., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2003). Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: The regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1591-1604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03786.x>
- Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T.-A., & Helmann, J. D. (2004). Antibiotic-Inducible Promoter Regulated by the Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 2888-2896. <https://doi.org/10.1128/aac.48.8.2888-2896.2004>
- Matar, G. M., Torrents, E., Rehm, B. H. A., Moradali, M. F., Fata Moradali, M., & Ghods, S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org, 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E., & Lory, S. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3100-3105. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0711982105>

- Maunder, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, *364*, 120. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>
- McCarthy, R. R., Mooij, M. J., Reen, F. J., Lesouhaitier, O., & O'Gara, F. (2014). A new regulator of pathogenicity (bvIR) is required for full virulence and tight microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*(PART 7), 1488-1500. <https://doi.org/10.1099/mic.0.075291-0>
- McCullough, J., Frost, A., & Sundquist, W. I. (2018). Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *34*(1), 85-109. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060600>
- McCullough, J., & Sundquist, W. I. (2020). Membrane Remodeling: ESCRT-III Filaments as Molecular Garrotes. *Current Biology*, *30*(23), R1425-R1428. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.086>
- 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. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(1), 39-50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McGowan, J. E. (2006). Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. *American Journal of Medicine*, *119*(6 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.014>
- Mcknight, S. L., Iglewski, B. H., & Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 182, Numéro 10, p. 2702-2708).
- Mcmanus, A. T., Moody, E. E., & Mason, A. D. (s. d.). Bacterial motility: A component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis*. In *Burns* (Vol. 6, p. 235-239).
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R., & Soberón-Chávez, G. (2003). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology*, *149*(11), 3073-3081. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26282-0>
- Meng, X., Ahator, S. D., & Zhang, L.-H. (2020). Molecular Mechanisms of Phosphate Stress Activation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems. *mSphere*, *5*(2). <https://doi.org/10.1128/msphere.00119-20>
- Metrick, C. M., Peterson, E. A., Santoro, J. C., Enyedy, I. J., Murugan, P., Chen, T., Michelsen, K., Cullivan, M., Spilker, K. A., Kumar, P. R., May-Dracka, T. L., & Chodaparambil, J. V. (2020). Human PLD structures enable drug design and characterization of isoenzyme selectivity. *Nature Chemical Biology*, *16*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0458-4>
- Mewe, M., Tielker, D., Schönberg, R., Schachner, M., Jaeger, K.-E., & Schumacher, U. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *The Journal of Laryngology & Otology*, *119*, 595-599. <https://doi.org/10.1258/0022215054516313>
- Michel, V., & Bakovic, M. (2007). Lipid rafts in health and disease. *Biology of the Cell*, *99*(3), 129-140. <https://doi.org/10.1042/BC20060051>
- Mielich-Süss, B., Wagner, R. M., Mietrach, N., Hertlein, T., Marincola, G., Ohlsen, K., Geibel, S., & Lopez, D. (2017). Flotillin scaffold activity contributes to type VII secretion

- system assembly in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens*, *13*(11), e1006728. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006728>
- Migliano, S. M., Wenzel, E. M., & Stenmark, H. (2022). Biophysical and molecular mechanisms of ESCRT functions, and their implications for disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *75*, 102062. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.01.007>
- Mikkelsen, H., McMullan, R., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS*. *PLoS ONE*, *6*(12), e29113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029113>
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1666-1681. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2011.02495.X>
- Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2000). Visualization of Phospholipid Domains in *Escherichia coli* by Using the Cardiolipin-Specific Fluorescent Dye 10-N-Nonyl Acridine Orange. *Journal of Bacteriology*, *182*(4), 1172-1175. <https://doi.org/10.1128/jb.182.4.1172-1175.2000>
- Miller, J. M., & Enemark, E. J. (2016). Fundamental Characteristics of AAA+ Protein Family Structure and Function. *Archaea*, *2016*, e9294307. <https://doi.org/10.1155/2016/9294307>
- Miller, R. A., Rasmussen, G. T., Cox, C. D., & Britigan, B. E. (1996). Protease cleavage of iron-transferrin augments pyocyanin-mediated endothelial cell injury via promotion of hydroxyl radical formation. *Infection and Immunity*, *64*(1), 182-188. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.1.182-188.1996>
- Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, *183*(20), 5848-5854. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>
- Mitsopoulos, P., Chang, Y.-H., Wai, T., König, T., Dunn, S. D., Langer, T., & Madrenas, J. (2015). Stomatin-Like Protein 2 Is Required for In Vivo Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplex Formation and Optimal Cell Function. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(10), 1838-1847. <https://doi.org/10.1128/MCB.00047-15>
- Mitsopoulos, P., Lapohos, O., Weraarpachai, W., Antonicka, H., Chang, Y.-H., & Madrenas, J. (2017). Stomatin-like protein 2 deficiency results in impaired mitochondrial translation. *PLOS ONE*, *12*(6), e0179967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179967>
- Miyahara, M., Kim, S. W., Fushinobu, S., Takaki, K., Yamada, T., Watanabe, A., Miyauchi, K., Endo, G., Wakagi, T., & Shoun, H. (2010). Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(14), 4619-4625. <https://doi.org/10.1128/AEM.01983-09/FORMAT/EPUB>
- Model, P., Jovanovic, G., & Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Molecular Microbiology*, *24*(2), 255-261. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.3481712.X>
- Mohammad, S., & Thiernemann, C. (2021). Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594150>

- Monroe, N., & Hill, C. P. (2016). Meiotic Clade AAA ATPases : Protein Polymer Disassembly Machines. *Journal of Molecular Biology*, 428(9, Part B), 1897-1911. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.004>
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.-H., Hassett, D. J., & Sauer, K. (2006). BdlA, a Chemotaxis Regulator Essential for Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7335-7343. <https://doi.org/10.1128/JB.00599-06>
- Morrow, I. C., & Parton, R. G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family : Rafts, worms and anaesthetics. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(9), 725-740. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00318.x>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., & Parton, R. G. (2002). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48834-48841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209082200>
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., & Mekalanos, J. J. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1621-1629. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02208.x>
- Mulcahy, H., O'callaghan, J., O'grady, E. P., Maciá, M. D., Borrell, N., Gómez, C., Casey, P. G., Hill, C., Adams, C., Gahan, C. G. M., Oliver, A., & O'gara, F. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* RsmA Plays an Important Role during Murine Infection by Influencing Colonization, Virulence, Persistence, and Pulmonary Inflammation. *INFECTION AND IMMUNITY*, 76(2), 632-638. <https://doi.org/10.1128/IAI.01132-07>
- Mulligan, C. N., & Gibbs, B. F. (1989a). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 3016-3019.
- Mulligan, C. N., & Gibbs, B. F. (1989b). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 3016-3019.
- Mulligan, C. N., Mahmoudides, G., & Gibbs, B. F. (1989). The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, 12(3-4), 199-209. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90041-2)
- Murray, T. S., & Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2700-2708. <https://doi.org/10.1128/JB.01620-07/FORMAT/EPUB>
- Murthy, R. (2001). Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*, 119(2 SUPPL.), 405S-411S. https://doi.org/10.1378/chest.119.2_suppl.405S

- Murzin, A. g. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold : Common structural and functional solution for non-homologous sequences. *The EMBO Journal*, *12*(3), 861-867. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05726.x>
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *76*(1), 46-65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- Nakai, K., Horton, P., Nakai, K., & Horton, P. (1999). PSORT : A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(1), 34-35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01336-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01336-X)
- Nelson, L. K., D'Amours, G. H., Sproule-Willoughby, K. M., Morck, D. W., & Ceri, H. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems are important for infection and inflammation in a rat prostatitis model. *Microbiology*, *155*(8), 2612-2619. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028464-0>
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in Microbiology*, *23*(4), 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.010>
- Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P. E., & Walmsley, H. L. (1988). Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *32*(4), 518-523. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.4.518>
- Nicolò, M. S., Cambria, M. G., Impallomeni, G., Rizzo, M. G., Pellicorio, C., Ballistreri, A., & Guglielmino, S. P. P. (2017). Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. *New Biotechnology*, *39*, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.013>
- Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M. K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M. C., & Nureki, O. (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, *491*(7423), Article 7423. <https://doi.org/10.1038/nature11509>
- Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O., & Contiero, J. (2010). Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(7), 2066-2074. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8707-8>
- Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K. ichi, 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. *Respiratory Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-21>
- O'Callaghan, J., Reen, F. J., Adams, C., & O'Gara, F. (2011). Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY. *Microbiology*, *157*(12), 3417-3428. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052050-0>
- Ochsner, U. A., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(31), 19787-19795. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32089-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32089-6)

- Ochsner, U. A., & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(14), 6424-6428.
- O'Connell, H. A., Kottkamp, G. S., Eppelbaum, J. L., Stubblefield, B. A., Gilbert, S. E., & Gilbert, E. S. (2006). Influences of Biofilm Structure and Antibiotic Resistance Mechanisms on Indirect Pathogenicity in a Model Polymicrobial Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 5013-5019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-05>
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L.-H., Fierke, C. A., Jackman, J. E., Raetz, C. R. H., Coleman, J., Tomoyasu, T., & Matsuzawa, H. (1999). Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *31*(3), 833-844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01221.x>
- Ogura, T., & Wilkinson, A. J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: Common structure–diverse function. *Genes to Cells*, *6*(7), 575-597. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x>
- Olmos, Y. (2022). The ESCRT Machinery: Remodeling, Repairing, and Sealing Membranes. *Membranes*, *12*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/membranes12060633>
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *34*(5), 877-886. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R., & Soberón-Chávez, G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, *179*(1), 85-90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08712.x>
- Omar Faruk Shaikh, M., Schaefer, M. M., Merakou, C., DiBlasi, M., Bonney, S., Liao, T., Zurakowski, D., Kehl, M., Tabor, D. E., DiGiandomenico, A., & Priebe, G. P. (2022). Multicomponent *Pseudomonas aeruginosa* Vaccines Eliciting Th17 Cells and Functional Antibody Responses Confer Enhanced Protection against Experimental Acute Pneumonia in Mice. <https://doi.org/10.1128/iai.00203-22>
- Onbasli, D., & Aslim, B. (2009). Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *Journal of Environmental Biology*, *30*(1), 161-163.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, *30*(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.01062.X>
- O'toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). *BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT*. www.annualreviews.org
- Otters, S., Braun, P., Hubner, J., Wanner, G., Vothknecht, U. C., & Chigri, F. (2013). The first α -helical domain of the vesicle-inducing protein in plastids 1 promotes oligomerization and lipid binding. *Planta*, *237*(2), 529-540. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1772-1>
- Otto, G. P., & Nichols, B. J. (2011). The roles of flotillin microdomains – endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science*, *124*(23), 3933-3940. <https://doi.org/10.1242/jcs.092015>

- Padilla-Vaca, F., Vargas-Maya, N. I., Elizarrarás-Vargas, N. U., Rangel-Serrano, Á., Cardoso-Reyes, L. R., Razo-Soria, T., Membrillo-Hernández, J., & Franco, B. (2019). Flotillin homologue is involved in the swimming behavior of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, *201*(7), 999-1008. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01670-8>
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Molecular Microbiology*, *68*(1), 223-240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x>
- Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *189*(6), 2531-2539. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-06>
- Park, S., & Galloway, D. R. (1995). Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *16*(2), 263-270. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1995.TB02298.X>
- Passos da Silva, D., Matwichuk, M. L., Townsend, D. O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D. J., Parsek, M. R., Matwichuk, 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. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10201-4>
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., & Poole, K. (2008). Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *190*(2), 662-671. <https://doi.org/10.1128/JB.01473-07>
- Pavlovskis, O. R., Iglewski, B. H., & Pollack, M. (1978). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: Adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infection and Immunity*, *19*(1), 29-33. <https://doi.org/10.1128/IAI.19.1.29-33.1978>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *179*(18), 5756-5767.
- Perraud, Q., Kuhn, L., Fritsch, S., Graulier, G., Gasser, V., Normant, V., Hammann, P., & Schalk, I. J. (2022). Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *24*(2), 878-893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15372>
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N. S., Bassler, B. L., Gitai, Z., & Stone, H. A. (2015). The Mechanical World of Bacteria. *Cell*, *161*(5), 988-997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005>
- Peters, J. E., & Galloway, D. R. (1990). Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: Enhancement of elastase activity. *Journal of Bacteriology*, *172*(5), 2236-2240. <https://doi.org/10.1128/JB.172.5.2236-2240.1990>

- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., & Heckler, M. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *183*(19), 5617-5631. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001>
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2012). Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* requires an unusual posttranslational modification of BdlA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(41), 16690-16695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207832109>
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way : Desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*, *30*, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Pichoff, S., Du, S., & Lutkenhaus, J. (2019). Roles of FtsEX in cell division. *Research in Microbiology*, *170*(8), 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.07.003>
- Pinkart, H. C., & White, D. C. (1998). Lipids of *Pseudomonas*. In T. C. Montie (Éd.), *Pseudomonas* (p. 111-138). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0120-0_4
- Pirlar, R. F., Emaneini, M., Beigverdi, R., Banar, M., Leeuwen, W. B. van, & Jabalameli, F. (2020). Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLOS ONE*, *15*(6), e0235093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235093>
- Pita, T., Feliciano, J. R., & Leitão, J. H. (2018). Small noncoding regulatory RNAs from *pseudomonas aeruginosa* and *burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123759>
- Plotkowski, M. C., de Bentzmann, S., Pereira, S. H. M., Zahm, J.-M., Bajolet-Laudinat, O., Roger, P., & Puchelle, E. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Human Epithelial Respiratory Cells Depends on Cell Differentiation, Polarity, and Junctional Complex Integrity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *20*(5), 880-890. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.5.3408>
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice : Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, *282*(5396), 2085-2088. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>
- Ponting, C. p., & Kerr, I. d. (1996). A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases : Identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Science*, *5*(5), 914-922. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050513>
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa : Resistance to the max*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Poonsuk, K., & Chuanchuen, R. (2014). Detection of the Mex Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* by Using a Combined Resistance-Phenotypic Markers and Multiplex RT-PCR. *Open Journal of Medical Microbiology*, *4*(3), Article 3. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2014.43018>
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* : Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *45*(6), 568-585. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2015.03.001>

- Prohaska, R., & Salzer, U. (2018). Flotillin-2 (FLOT2). In S. Choi (Éd.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (p. 1778-1786). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_646
- Puchades, C., Sandate, C. R., & Lander, G. C. (2020). The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA+ proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(1), 43-58. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0183-6>
- Pulcrano, G., Iula, D. V., Raia, V., Rossano, F., & Catania, M. R. (2012). Different mutations in mucA gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on algU gene expression. *NEW MICROBIOLOGICA*, 35, 295-305.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A., & Finn, R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D290-D301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1065>
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W. J., & Stoodley, P. (2005). Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology*, 151(5), 1569-1576. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27536-0>
- Putman, M., van Veen, H. W., & Konings, W. N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 672-693.
- Qiao, Z., Yokoyama, T., Yan, X.-F., Beh, I. T., Shi, J., Basak, S., Akiyama, Y., & Gao, Y.-G. (2022). Cryo-EM structure of the entire FtsH-HflKC AAA protease complex. *Cell Reports*, 39(9), 110890. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110890>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Qiu, D., Eisinger, V. M., Rowen, D. W., & Yu, H. D. (2007). Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8107-8112. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0702660104>
- Qiu, X., Gurkar, A. U., & Lory, S. (2006). Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19830-19835. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606810104>
- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A., & Attree, I. (2005). The PscE-PscF-PscG Complex Controls Type III Secretion Needle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa**. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36293-36300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508089200>
- Rada, B., & Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology*, 21(2), 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.004>
- Rahim, R., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B., & Lam, J. S. (2000). Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 146(11), 2803-2814. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-11-2803>

- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G. (2001a). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnopolysaccharide transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, *40*(3), 708-718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G. (2001b). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnopolysaccharide transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, *40*(3), 708-718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>
- Ramana, K. V., & Karanth, N. G. (1989a). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *45*(4), 249-257. <https://doi.org/10.1002/jctb.280450402>
- Ramana, K. V., & Karanth, N. G. (1989b). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *45*(4), 249-257. <https://doi.org/10.1002/jctb.280450402>
- Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology*, *56*(2), 309-322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x>
- Ran, H., Hassett, D. J., & Lau, G. W. (2003). Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(24), 14315-14320. <https://doi.org/10.1073/pnas.2332354100>
- Ravi, J., Anantharaman, V., Chen, S. Z., Datta, P., Aravind, L., & Gennaro, M. L. (2020). *Phage-shock-protein (Psp) Envelope Stress Response: Evolutionary History & Discovery of Novel Players*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.301986>
- Rawling, E. G., Brinkman, F. S. L., & Hancock, R. E. W. (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. *Journal of Bacteriology*, *180*(14), 3556-3562. <https://doi.org/10.1128/jb.180.14.3556-3562.1998>
- Raya, A., Sodagari, M., Pinzon, N. M., He, X., Zhang Newby, B., & Ju, L.-K. (s. d.). *Effects of rhamnolipids and shear on initial attachment of Pseudomonas aeruginosa PAO1 in glass flow chambers*. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0339-6>
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*, *580*(16), 3883-3888. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.05.077>
- Rendell, N. B., Taylor, G. W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R., & Cole, P. J. (1990). Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1045*(2), 189-193. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90150-V](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90150-V)
- Renner, L. D., & Weibel, D. B. (s. d.). *Physicochemical regulation of biofilm formation*. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>

- Rhee, S. H. (2014). Lipopolysaccharide : Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut. *Intestinal Research*, 12(2), 90-95. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.2.90>
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L., & Lam, J. S. (1999). Genetics of O-Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 523-553. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999/FORMAT/EPUB>
- Rogers, A. R., Turner, E. E., Johnson, D. T., & Ellermeier, J. R. (2022). Envelope Stress Activates Expression of the Twin Arginine Translocation (Tat) System in Salmonella. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e01621-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01621-22>
- Roll-Mecak, A., & McNally, F. J. (2010). Microtubule-severing enzymes. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(1), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.001>
- Roll-Mecak, A., & Vale, R. D. (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*, 451(7176), Article 7176. <https://doi.org/10.1038/nature06482>
- Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D. E., Gill, C., Stalker, L., & Wood, J. M. (2007). Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 64(6), 1455-1465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05727.x>
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229-236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ray, K. J., & Kuo, T.-M. (2009). Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiology Letters*, 295(1), 82-87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01581.x>
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., & Paulsen, I. T. (2010). Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLOS ONE*, 5(1), e8842. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008842>
- Ruff, K. M., & Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), 167208. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167208>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014). Type VI secretion system effectors : Poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., & Dow, J. M. (2006). Cyclic di-GMP signaling in bacteria : Recent advances and new puzzles. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8327-8334. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-06>
- Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*, 10(6), 644-648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>

- Saffiedine, B. (2019). *Contribution à l'étude du système BAC « Biofilm Associated Cluster » chez Pseudomonas aeruginosa*. [These de doctorat, Normandie].
<https://www.theses.fr/2019NORMR018>
- Saikawa, N., Akiyama, Y., & Ito, K. (2004). FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of Escherichia coli. *Journal of Structural Biology*, 146(1), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.09.020>
- Saiman, L., Marshall, B. C., Mayer-Hamblett, N., Burns, J. L., Quittner, A. L., Cibene, D. A., Coquillotte, S., Fieberg, A. Y., Accurso, F. J., Campbell III, P. W., & for the Macrolide Study Group. (2003). Azithromycin in Patients With Cystic Fibrosis Chronically Infected With Pseudomonas aeruginosa A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 290(13), 1749-1756. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1749>
- Saiman, L., & Prince, A. (1993). Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1875-1880. <https://doi.org/10.1172/JCI116779>
- Saint-Criq, V., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Sermet-Gaudelus, I., Garcia-Verdugo, I., Edelman, A., & Sallenave, J. M. (2018). Pseudomonas aeruginosa LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax*, 73(1), 49-61.
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210298>
- Sakuragi, Y., & Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5383-5386.
<https://doi.org/10.1128/JB.00137-07>
- Salazar-Bryam, A. M., Yoshimura, I., Santos, L. P., Moura, C. C., Santos, C. C., Silva, V. L., Lovaglio, R. B., Costa Marques, R. F., Jafelicci Junior, M., & Contiero, J. (2021). Silver nanoparticles stabilized by ramnolipids: Effect of pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 205, 111883. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111883>
- Samanta, S., Bodrenko, I., Acosta-Gutiérrez, S., D'Agostino, T., Pathania, M., Ghai, I., Schleberger, C., Bumann, D., Wagner, R., Winterhalter, M., Van Den Berg, B., & Ceccarelli, M. (2018). Getting Drugs through Small Pores: Exploiting the Porins Pathway in Pseudomonas aeruginosa. *ACS Infectious Diseases*, 4(10), 1519-1528.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00149>
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T., & Hill, J. E. (2015). Pseudomonas chemotaxis. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 17-46. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081>
- Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K. L., Filloux, A., Superti-Furga, G., Voulhoux, R., & Bleves, S. (2015). Internalization of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *mBio*, 6(3), 10.1128/mbio.00712-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00712-15>
- Sana, T. G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., Bleves, S., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., & Bleves, S. (2012). The Second Type VI Secretion System of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 Is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27095-27105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368>
- Sandt, C., Smith-Palmer, T., Pink, J., Brennan, L., & Pink, D. (2007). Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in

- situ : Biofilm Raman microspectroscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1808-1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03413.x>
- Sarubbo, L. A., Silva, M. D. G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants : Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., & Gilbert, P. (2004). Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7312-7326. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle– expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature reviews. Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sayner, S. L., Frank, D. W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., & Stevens, T. (2004). Paradoxical cAMP-Induced Lung Endothelial Hyperpermeability Revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circulation Research*, 95(2), 196-203. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000134922.25721.d9>
- Schaeffer, R. D., Jonsson, A. L., Simms, A. M., & Daggett, V. (2011). Generation of a consensus protein domain dictionary. *Bioinformatics*, 27(1), 46-54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq625>
- Schalk, I. J., & Perraud, Q. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>
- Scheuerman, T. R., Camper, A. K., & Hamilton, M. A. (1998). *Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion*.
- Schleheck, D., Barraud, N., Klebensberger, J., Webb, J. S., McDougald, D., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Preferentially Grows as Aggregates in Liquid Batch Cultures and Disperses upon Starvation. *PLOS ONE*, 4(5), e5513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005513>
- Schobert, M., & Jahn, D. (2010). Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 549-556. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.08.007>
- Schrecke, K., Jordan, S., & Mascher, T. (2013). Stoichiometry and perturbation studies of the LiaFSR system of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 87(4), 769-788. <https://doi.org/10.1111/mmi.12130>
- Schroeder, W. T., Stewart-Galetka, S., Mandavilli, S., Parry, D. A., Goldsmith, L., & Duvic, M. (1994). Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA). *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19983-19991. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32117-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32117-8)
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 124(2), 577-587. <https://doi.org/10.1242/dev.124.2.577>
- Schultz, M. J., Speelman, P., Zaat, S. A. J., Hack, C. E., Van Deventer, S. J. H., & Van Der Poll, T. (s. d.). *The effect of Pseudomonas exotoxin A on cytokine production in*

- whole blood exposed to Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01527.x>
- Scott, A., Chung, H.-Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G. C., Whitby, F. G., Gaspar, J., Holton, J. M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C. P., & Sundquist, W. I. (2005). Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *The EMBO Journal*, *24*(20), 3658-3669. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600818>
- Seed, P. C., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology*, *177*(3), 654-659. <https://doi.org/10.1128/JB.177.3.654-659.1995>
- Semmler, A. B. T., Whitchurch, C. B., & Mattick, J. S. (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Microbiology* (Vol. 145, p. 2863-2873). www.cmcb.uq.edu.au
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., Finn Gottrup, ;, Gurtner, G. C., Michael, ;, & Longaker, T. (2009). *Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy*. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>
- Seo, J., Brencic, A., & Darwin, A. J. (2009). Analysis of secretin-induced stress in *Pseudomonas aeruginosa* suggests prevention rather than response and identifies a novel protein involved in secretin function. *Journal of Bacteriology*, *191*(3), 898-908. <https://doi.org/10.1128/JB.01443-08>
- Seraphim, T. V., & Houry, W. A. (2020). AAA+ proteins. *Current Biology*, *30*(6), R251-R257. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.044>
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *195*(24), 5540-5554. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>
- Seyer, D. (2006). *Recherche de nouvelles cibles moléculaires contre la bactérie Pseudomonas aeruginosa organisée en biofilm* [These de doctorat, Rouen]. <https://www.theses.fr/2006ROUES014>
- Shaver, C. M., & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*, *72*(12), 6969-6977. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004>
- Shaw, N. (1970). Bacterial Glycolipids. *Bacteriological Reviews*, *34*(4), 365-377.
- Shen, Y., Atreya, H. S., Liu, G., & Szyperski, T. (2005). G-Matrix Fourier Transform NOESY-Based Protocol for High-Quality Protein Structure Determination. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(25), 9085-9099. <https://doi.org/10.1021/ja0501870>
- 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*, *172*(6), 1294-1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.050>
- Shibuya, I. (1992). Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Progress in Lipid Research*, *31*(3), 245-299. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(92\)90010-G](https://doi.org/10.1016/0163-7827(92)90010-G)
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., & Usui, T. (1997). Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A simple method. *Chemotherapy*, *43*(5), 340-345. <https://doi.org/10.1159/000239587>

- Short, S. A., & White, D. C. (1971). Metabolism of Phosphatidylglycerol, Lysylphosphatidylglycerol, and Cardiolipin of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *108*(1), 219-226. <https://doi.org/10.1128/jb.108.1.219-226.1971>
- Siebenaller, C., Junglas, B., Lehmann, A., Hellmann, N., & Schneider, D. (2020). Proton Leakage Is Sensed by IM30 and Activates IM30-Triggered Membrane Fusion. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms21124530>
- Siebenaller, C., Junglas, B., & Schneider, D. (2019). Functional Implications of Multiple IM30 Oligomeric States. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01500>
- Signorile, A., Sgaramella, G., Bellomo, F., & De Rasmio, D. (2019). Prohibitins: A Critical Role in Mitochondrial Functions and Implication in Diseases. *Cells*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/cells8010071>
- Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D344-347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Skillman, L. C., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of Applied Microbiology*, *85*(S1), 13S-18S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05278.x>
- Skov, M., Hansen, C. R., & Pressler, T. (2019). Cystic fibrosis – an example of personalized and precision medicine. *APMIS*, *127*(5), 352-360. <https://doi.org/10.1111/apm.12915>
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(1), 56-60. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00008-0)
- Sohlenkamp, C., Salvador, D., Sanchez, Z., Bertoni, G., Falcone, M., Ferrara, S., Rossi, E., Johansen, H. K., & Molin, S. (2018). *The Small RNA ErsA of Pseudomonas aeruginosa Contributes to Biofilm Development and Motility through Post-transcriptional Modulation of AmrZ*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00238>
- Sonawane, A., Jyot, J., & Ramphal, R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. *Infection and Immunity*, *74*(12), 7035-7039. <https://doi.org/10.1128/IAI.00551-06>
- Song, H., Ahmad Nor, Y., Yu, M., Yang, Y., Zhang, J., Zhang, H., Xu, C., Mitter, N., & Yu, C. (2016). Silica Nanopollens Enhance Adhesion for Long-Term Bacterial Inhibition. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(20), 6455-6462. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00243>
- 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. *Molecular Microbiology*, *80*(4), 868-885. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07620.X>
- Soto, M. J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F. M., Mercado-Blanco, J., López-Lara, I. M., Olivares, J., & Toro, N. (1994). Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency nfe gene homolog of *Agrobacterium ornithine cyclodeaminase*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *7*(6), 703-707. <https://doi.org/10.1094/mpmi-7-0703>
- Southern, S. J., Male, A., Milne, T., Sarkar-Tyson, M., Tavassoli, A., & Oyston, P. C. F. (2015). Evaluating the role of phage-shock protein A in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology*, *161*(Pt 11), 2192-2203. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000175>

- Standar, K., Mehner, D., Osadnik, H., Berthelmann, F., Hause, G., Lünsdorf, H., & Brüser, T. (2008). PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, *582*(25-26), 3585-3589. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.002>
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, *292*(2), 107-113. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *185*(5), 1485-1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(3), 199-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 187-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Stover, C. K., Pham², X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman³, F. S. L., 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., Kas², A., ... Olson², M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *NATURE*, *406*. www.nature.com
- Strateva, T., & Yordanov, D. (s. d.). *Pseudomonas aeruginosa-a phenomenon of bacterial resistance*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Strempel, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O., Brenner-Weiss, G., & Overhage, J. (2013). Human Host Defense Peptide LL-37 Stimulates Virulence Factor Production and Adaptive Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, *8*(12), e82240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082240>
- Striebel, F., Kress, W., & Weber-Ban, E. (2009). Controlled destruction : AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Current Opinion in Structural Biology*, *19*(2), 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.006>
- Stuckey, J. A., & Dixon, J. E. (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature Structural Biology*, *6*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/6716>
- Stuermer, C. A. O. (2011). Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo. *Journal of Neurochemistry*, *116*(5), 708-713. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07007.x>
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., & Geesey, G. G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(9), 2125-2133.
- Suh, S.-J., Invally, K., & Ju, L.-K. (2019). Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential. In *Biobased Surfactants* (p. 169-203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00005-8>
- Suh, S.-J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E. H., & Ohman, D. E. (1999). Effect of rpoS Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *181*(13), 3890-3897.
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps : Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *453*(2), 254-267. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.05.090>

- Suno, R., Niwa, H., Tsuchiya, D., Zhang, X., Yoshida, M., & Morikawa, K. (2006). Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH. *Molecular Cell*, *22*(5), 575-585. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.020>
- Svensson, S. L., & Sharma, C. M. (2016). Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication. *Microbiology Spectrum*, *4*(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0028-2015>
- Syldatk, C., Lang, S., Wray, V., & Witte, L. (s. d.). *Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from Pseudomonas spec. DSM 2874 Grown on /i-Alkanes*.
- Takekawa, N., Isumi, M., Terashima, H., Zhu, S., Nishino, Y., Sakuma, M., Kojima, S., Homma, M., & Imada, K. (2019). Structure of Vibrio FliL, a New Stomatin-like Protein That Assists the Bacterial Flagellar Motor Function. *mBio*, *10*(2), 10.1128/mbio.00292-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.00292-19>
- Tamber, S., & Hancock, R. E. W. (2003). ON THE MECHANISM OF SOLUTE UPTAKE IN PSEUDOMONAS. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 8, p. 472).
- Tatsuta, T., & Langer, T. (2009). AAA proteases in mitochondria : Diverse functions of membrane-bound proteolytic machines. *Research in Microbiology*, *160*(9), 711-717. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.09.005>
- Tatsuta, T., Model, K., & Langer, T. (2005). Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(1), 248-259. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0807>
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyrpides, N. C. (1999). The SPFH domain : Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(11), 425-427. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01467-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01467-X)
- Taylor, P. K., Van Kessel, A. T. M., Colavita, A., Hancock, R. E. W., & Mah, T.-F. (2017). A novel small RNA is important for biofilm formation and pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, *12*(8), e0182582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182582>
- Teixeira-Nunes, M., Retailleau, P., Comisso, M., Deruelle, V., Mechold, U., & Renault, L. (2022). Bacterial Nucleotidyl Cyclases Activated by Calmodulin or Actin in Host Cells : Enzyme Specificities and Cytotoxicity Mechanisms Identified to Date. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms23126743>
- Thayer, M. M., Flaherty, K. M., & McKay, D. B. (1991). Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(5), 2864-2871. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49927-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49927-9)
- Theobald, D. L., Mitton-Fry, R. M., & Wuttke, D. S. (2003). Nucleic Acid Recognition by OB-Fold Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *32*(1), 115-133. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142506>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L.-P., & Mi, H. (2022). PANTHER : Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, *31*(1), 8-22. <https://doi.org/10.1002/pro.4218>

- Thomason, M. K., & Storz, G. (2010). *Bacterial Antisense RNAs: How Many Are There, and What Are They Doing?* *. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163523>
- Thomsen, K., Christophersen, L., Strup Jensen, P. ;, Bjarnsholt, T., Moser, C., & Høiby, N. (2016). *Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils.* <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1145848>
- Thurotte, A., & Schneider, D. (2019). The Fusion Activity of IM30 Rings Involves Controlled Unmasking of the Fusogenic Core. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00108>
- Tidhar, A., Levy, Y., Zauberman, A., Vagima, Y., Gur, D., Aftalion, M., Israeli, O., Chitlaru, T., Ariel, N., Flashner, Y., Zvi, A., & Mamroud, E. (2019). Disruption of the NlpD lipoprotein of the plague pathogen *Yersinia pestis* affects iron acquisition and the activity of the twin-arginine translocation system. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007449. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007449>
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., & Jaeger, K. E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 151(5), 1313-1323. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27701-0>
- Tiso, T., Ihling, N., Kubicki, S., Biselli, A., Schonhoff, A., Bator, I., Thies, S., Karmainski, T., Kruth, S., Willenbrink, A.-L., Loeschcke, A., Zapp, P., Jupke, A., Jaeger, K.-E., Büchs, J., & Blank, L. M. (2020). Integration of Genetic and Process Engineering for Optimized Rhamnolipid Production Using *Pseudomonas putida*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 976. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00976>
- Toder, D. S., Ferrell, S. J., Nezezon, J. L., Rust, L., Iglewski, B. H., Toder, S., Gambello, M. J., Iglewski, B. H., Peters, J. E., Galloway, D. R., & Bacteriol, J. (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of transcription and gene product activity. *Infection and Immunity*, 62(4), 1320-1327. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.4.1320-1327.1994>
- Toledo, A., Pérez, A., Coleman, J. L., & Benach, J. L. (2015). The lipid raft proteome of *Borrelia burgdorferi*. *PROTEOMICS*, 15(21), 3662-3675. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500093>
- Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A. j., Oppenheim, A. b., Yura, T., Yamanaka, K., & Niki, H. (1995). *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *The EMBO Journal*, 14(11), 2551-2560. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07253.x>
- Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F., & Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2622-2630. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01396.x>
- Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
- Triandafillu, K. (2003). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials*, 24(8), 1507-1518. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00515-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00515-X)

- Trias, J., & Nikaido, H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(1), 52-57. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.1.52>
- Trottmann, F., Franke, J., Ishida, K., García-Altres, M., & Hertweck, C. (2019). A Pair of Bacterial Siderophores Releases and Traps an Intercellular Signal Molecule: An Unusual Case of Natural Nitron Bioconjugation. *Angewandte Chemie*, *131*(1), 206-210. <https://doi.org/10.1002/ange.201811131>
- Troudi, A. (2022). *Nouveaux agents chimiosensibilisants pour lutter contre la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif* [These de doctorat, Aix-Marseille]. <https://www.theses.fr/2022AIXM0090>
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J., Singh, P. K., Chopp, D. L., Packman, A. I., & Parsek, M. R. (2013). The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental microbiology*, *15*(10), 2865-2878. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12155>
- Tsui, H. T., Leung, H. E., & Winkler, M. E. (1994). Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, *13*(1), 35-49. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1994.TB00400.X>
- Turkina, M. V., & Vikström, E. (2019). Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Innate Immun*, *11*, 263-279. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- UniProt Consortium. (2008). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, *36*(Database issue), D190-195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm895>
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., & Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology*, *6*, 1525-1533. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03935.x>
- Valentini, M., & Filloux, A. (2016). *Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria* * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(1), 171-176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507407103>
- Vietri, M., Radulovic, M., Stenmark, H., Radulovic, M., & Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., & Jouenne, T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: A multivariate statistical approach. *Analytical Biochemistry*, *329*(1), 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.014>
- Voigt, F., Reuter, M., Kasaruho, A., Schulz, E. C., Pillai, R. S., & Barabas, O. (2012). Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease Nuc. *RNA*, *18*(12), 2128-2134. <https://doi.org/10.1261/rna.034967.112>

- Vothknecht, U. C., Otters, S., Hennig, R., & Schneider, D. (2012). Vipp1 : A very important protein in plastids?! *Journal of Experimental Botany*, *63*(4), 1699-1712. <https://doi.org/10.1093/jxb/err357>
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO Journal*, *20*(23), 6735-6741. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6735>
- Vrancken, K., De Keersmaecker, S., Geukens, N., Lammertyn, E., Anné, J., & Van Mellaert, L. (2007). pspA overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *73*(5), 1150-1157. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0571-7>
- Vrancken, K., Van Mellaert, L., & Anné, J. (2008). Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. *Journal of Bacteriology*, *190*(10), 3475-3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01966-07>
- Vrany, J. D., Stewart, P. S., & Suci, P. A. (1997). Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(6), 1352-1358.
- Wagner, S. L., Fritz. (1987). Structure and Properties of Biosurfactants. In *Biosurfactants and Biotechnology*. Routledge.
- 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. *Journal of Bacteriology*, *185*(7), 2080-2095. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2080-2095.2003>
- Wai, T., Saita, S., Nolte, H., Müller, S., König, T., Richter-Dennerlein, R., Sprenger, H.-G., Madrenas, J., Mühlmeister, M., Brandt, U., Krüger, M., & Langer, T. (2016). The membrane scaffold SLP2 anchors a proteolytic hub in mitochondria containing PARL and the i-AAA protease YME1L. *EMBO reports*, *17*(12), 1844-1856. <https://doi.org/10.15252/embr.201642698>
- Walker, C. A., Hinderhofer, M., Witte, D. J., Boos, W., & Möller, H. M. (2008). Solution structure of the soluble domain of the NfeD protein YuaF from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biomolecular NMR*, *42*(1), 69-76. <https://doi.org/10.1007/s10858-008-9261-3>
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources : From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 611-647. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>
- 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*. *Environmental microbiology reports*, *7*(2), 330-340. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
- Wang, S., Parsek, M. R., Wozniak, D. J., & Ma, L. Z. (2013). A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, *15*(8), 2238-2253. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12095>
- Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., Noce, T., Nakano, T., Nakatsuji, N., Lin, H., & Sasaki, H. (2011). MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage

- formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Developmental Cell*, 20(3), 364-375. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.005>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Welte, W., Nestel, U., Wacker, T., & Diederichs, K. (1995). Structure and function of the porin channel. *Kidney International*, 48(4), 930-940. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.374>
- Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M., & Kube, S. (2012). Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(1), 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.014>
- Wessel, A. K., Yoshii, Y., Reder, A., Boudjemaa, R., Szczesna, M., Betton, J.-M., Bernal-Bayard, J., Beloin, C., Lopez, D., Völker, U., & Ghigo, J.-M. (2023). Escherichia coli SPFH Membrane Microdomain Proteins HflKC Contribute to Aminoglycoside and Oxidative Stress Tolerance. *Microbiology Spectrum*, 0(0), e01767-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01767-23>
- Westphal, S., Heins, L., Soll, J., & Vothknecht, U. C. (2001). Vipp1 deletion mutant of Synechocystis: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4243-4248. <https://doi.org/10.1073/pnas.061501198>
- Wetzel, C., Hu, J., Riethmacher, D., Benckendorff, A., Harder, L., Eilers, A., Moshourab, R., Kozlenkov, A., Labuz, D., Caspani, O., Erdmann, B., Machelska, H., Heppenstall, P. A., & Lewin, G. R. (2007). A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature*, 445(7124), Article 7124. <https://doi.org/10.1038/nature05394>
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Whiteley, M., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2000). Regulation of Quorum Sensing by RpoS in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4356-4360.
- Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., De Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., & Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, 92(3), 529-542. <https://doi.org/10.1111/mmi.12571>
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., & Jaeger, K.-E. (2007). The Autotransporter Esterase EstA of Pseudomonas aeruginosa Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 189(18), 6695-6703. <https://doi.org/10.1128/jb.00023-07>

- Wilhelm, S., Tommassen, J., & Jaeger, K.-E. (1999). A Novel Lipolytic Enzyme Located in the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *181*(22), 6977-6986. <https://doi.org/10.1128/jb.181.22.6977-6986.1999>
- Wilking, J. N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M. P., & Weitz, D. A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(3), 848-852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216376110>
- Williams, K. P. (2002). Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: Sublocation preference of integrase subfamilies. *SURVEY AND SUMMARY*, *30*(4), 866-875.
- Williamson, K. S., Dlakić, M., Akiyama, T., & Franklin, M. J. (2023). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoH (σ 32) Regulon and Its Role in Essential Cellular Functions, Starvation Survival, and Antibiotic Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms24021513>
- Wilson, C. B., Jones, P. W., O'Leary, C. J., Hansell, D. M., Cole, P. J., & Wilson, R. (1997). Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. *European Respiratory Journal*, *10*(8), 1754-1760. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10081754>
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., & Lewenza, S. (2015). Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(1), 544-553. <https://doi.org/10.1128/AAC.01650-15>
- Winson, M. K., CAMARAt, M., Latifi, A., Foglino, M., RAM CHHABRAt, S., DAYKINt, Ma., BALLYt, M., CHAPONt, V., C Salmond, G. P., BYCROFTt, B. W., LAZDUNSKI, A., A B Stewart, G. S., & WILLIAMSt, P. (1995). *Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in Pseudomonas aeruginosa (autoinducers/quorum sensing/gene regulation)*. *92*, 9427-9431.
- Winstanley, C., Langille, M. G. I., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R. E. W., Brinkman, F. S. L., & Levesque, R. C. (2009). *Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1101/gr.086082.108>
- Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections*. *Trends in Microbiology*, *24*(5), 327-337. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.01.008>
- Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszczak, A., Mäder, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., Voigt, B., Hecker, M., & Mascher, T. (2010). In-Depth Profiling of the LiaR Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *192*(18), 4680-4693. <https://doi.org/10.1128/jb.00543-10>
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Garrett Miyada, C., & Lory, S. (2003). *Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa*. www.Pseudomonas.com

- Wood, J. M. (1999). Osmosensing by Bacteria : Signals and Membrane-Based Sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 230-262. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.230-262.1999>
- Wood, L. F., & Ohman, D. E. (2014). *Cell wall stress activates expression of a novel stress response facilitator (SrfA) under s 22 (AlgT/U) control in Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081182-0>
- 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 PA01 *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7907-7912.
- Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; A preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, 34(4), 349-357. <https://doi.org/10.1111/J.1749-4486.2009.01973.X>
- Wu, C. H., Yeh, L.-S. L., Huang, H., Arminski, L., Castro-Alvear, J., Chen, Y., Hu, Z., Kourtesis, P., Ledley, R. S., Suzek, B. E., Vinayaka, C. R., Zhang, J., & Barker, W. C. (2003). The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 345-347. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg040>
- Yamaguchi, M., Sato, A., & Yukuyama, A. (1976). ChemInform Abstract : MICROBIAL PRODUCTION OF SUGAR-LIPIDS. *Chemischer Informationsdienst*, 7(52), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.197652399>
- Yamaguchi, S., & Darwin, A. J. (2012). Recent findings about the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein response. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1578-7>
- Yang, C., & Montgomery, M. (2018). Dornase alfa for cystic fibrosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(9), CD001127. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001127.pub4>
- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2009). Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 74(6), 1380-1392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06934.x>
- Yang, X., Li, Z., Zhao, L., She, Z., Gao, Z., Sui, S.-F., Dong, Y., Li, Y., Li, Z., Zhao, L., She, Z., Gao, Z., Sui, S.-F., Dong, Y., & Li, Y. (2022). Structural insights into PA3488-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PldA. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33690-2>
- Yang, Z., Schneider, D., Brüser, T., Bramkamp, M., Savietto Scholz, A., Baur, S. S. M., & Wolf, D. (2021). *An Stomatin, Prohibitin, Flotillin, and HflK/C-Domain Protein Required to Link the Phage-Shock Protein to the Membrane in Bacillus subtilis*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754924>
- Yao, Y., Li, J., Lin, Y., Zhou, J., Zhang, P., & Xu, Y. (2021). Structural insights into phospholipase D function. *Progress in Lipid Research*, 81, 101070. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101070>
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H., & Yokota, T. (1993). Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1749-1755.

- Yasuhiro, K., Tiekō, Y., & Hideo, H. (1972). Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *280*(3), 444-450. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90251-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90251-2)
- Ye, L., Cornelis, P., Guillemin, K., Ballet, S., Christophersen, C., & Hammerich, O. (2014). Structure Revision of N-Mercapto-4-formylcarbostyryl Produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-Hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. In *NPC Natural Product Communications* (Vol. 9, Numéro 6, p. 789-794).
- Ye, Q., Rosenberg, S. C., Moeller, A., Speir, J. A., Su, T. Y., & Corbett, K. D. (2015). TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching. *eLife*, *4*, e07367. <https://doi.org/10.7554/eLife.07367>
- Yeung, A. T. Y., Parayno, A., & Hancock, R. E. W. (2012). Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, *3*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00073-12/FORMAT/EPUB>
- Yokoyama, H., Fujii, S., & Matsui, I. (2008). Crystal Structure of a Core Domain of Stomatin from *Pyrococcus horikoshii* Illustrates a Novel Trimeric and Coiled-Coil Fold. *Journal of Molecular Biology*, *376*(3), 868-878. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.024>
- Yokoyama, H., Matsui, E., Akiba, T., Harata, K., & Matsui, I. (2006). Molecular structure of a novel membrane protease specific for a stomatin homolog from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Journal of Molecular Biology*, *358*(4), 1152-1164. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.052>
- Yokoyama, H., & Matsui, I. (2005). A novel thermostable membrane protease forming an operon with a stomatin homolog from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus horikoshii*. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(8), 6588-6594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411748200>
- Yokoyama, H., & Matsui, I. (2014). Crystal structure of the stomatin operon partner protein from *Pyrococcus horikoshii* indicates the formation of a multimeric assembly. *FEBS Open Bio*, *4*, 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.09.002>
- Yoon, 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., & Hasset, D. J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: Relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell*, *3*(4), 593-603. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00295-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00295-2)
- Yu, S., Su, T., Wu, H., Liu, S., Wang, D., Zhao, T., Jin, Z., Du, W., Zhu, M.-J., Chua, S. L., Yang, L., Zhu, D., Gu, L., & Ma, L. Z. (2015). PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Research*, *25*(12), 1352-1367. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.129>
- Zamyatina, A. (2018). Aminosugar-based immunomodulator lipid A: Synthetic approaches. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *14*, 25-53. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.3>
- Zhang, J., Xu, K., Ambati, B., & Yu, F. S. X. (2003). Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *44*(10), 4247-4254. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0219>
- Zhang, L., Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U. C., & Sakamoto, W. (2012). Essential Role of VIPP1 in Chloroplast Envelope Maintenance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(9), 3695-3707. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103606>

- Zhang, L., Kondo, H., Kamikubo, H., Kataoka, M., & Sakamoto, W. (2016). VIPP1 Has a Disordered C-Terminal Tail Necessary for Protecting Photosynthetic Membranes against Stress. *Plant Physiology*, *171*(3), 1983-1995. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00532>
- Zhang, S., & Mao, Y. (2020). AAA+ ATPases in Protein Degradation : Structures, Functions and Mechanisms. *Biomolecules*, *10*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom10040629>
- Zhang, Y., & Miller, R. M. (1994). Effect of a Pseudomonas rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(6), 2101-2106.
- Zhao, F., Zhang, J., Liu, Y.-S., Li, L., & He, Y.-L. (2011). Research advances on flotillins. *Virology Journal*, *8*(1), 479. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-479>
- Zhao, Y., Stuckey, J. A., Lohse, D. L., & Dixon, J. E. (1997). Expression, characterization, and crystallization of a member of the novel phospholipase D family of phosphodiesterases. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *6*(12), 2655-2658.
- Zhu, K., & Rock, C. O. (2008). RhlA Converts β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate Component of Rhamnolipids in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *190*(9), 3147-3154. <https://doi.org/10.1128/JB.00080-08>
- Zhu, W., Li, W., Geng, Q., Wang, X., Sun, W., Jiang, H., & Pu, X. (2018). Silence of Stomatin-Like Protein 2 Represses Migration and Invasion Ability of Human Liver Cancer Cells via Inhibiting the Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Pathway. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *24*, 7625-7632. <https://doi.org/10.12659/MSM.909156>
- Zielińska, A., Savietto, A., de Sousa Borges, A., Martinez, D., Berbon, M., Roelofsen, J. R., Hartman, A. M., de Boer, R., Van der Klei, I. J., Hirsch, A. K., Habenstein, B., Bramkamp, M., & Scheffers, D.-J. (2020). Flotillin-mediated membrane fluidity controls peptidoglycan synthesis and MreB movement. *eLife*, *9*, e57179. <https://doi.org/10.7554/eLife.57179>
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., & Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1664-1673. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018>

Productions scientifiques

I. Liste des publications

- L. Wallart, E. Dé, J. Hardouin, P. Cosette, T. Jouenne. The Biofilm Resistance: Many Responses but Still Many Questions. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2023, 51 (4), pp.42895-42900. (10.26717/BJSTR.2023.51.008133). (hal-04190338)
- L. Wallart, MA Ben Mlouka, B. Saffiedine, L. Coquet, H. LE, J. Hardouin, T. Jouenne, G. Phan, MC Keiffer-Meyer, E. Girard, I. Broutin, P. Cosette.

II. Communication nationale

- L. Wallart, MA Ben Mlouka, L. Coquet, J. Hardouin, T. Jouenne, P. Cosette. Involvement of the “biofilm-associated-cluster” in *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid secretion. Journée de l'École Doctorale de Chimie, 23 juin 2022, Rouen, France. (Voir page suivante).
- L. Wallart, MA Ben Mlouka, L. Coquet, J. Hardouin, H. Le, T. Jouenne, P. Cosette. A new potential target to avoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Journée de Rencontre Normande de Microbiologie, 22 mai 2023, Rouen, France. (Voir page suivante).

III. Communication internationale

- L. Wallart, MA Ben Mlouka, L. Coquet, J. Hardouin, T. Jouenne, P. Cosette. Involvement of the “biofilm-associated-cluster” in *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid secretion. Analytics, du 05 au 08 septembre 2022, Nantes, France. (Voir page suivante).



Involvement of the “biofilm-associated-cluster” in *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid secretion

L. Wallart,¹ A. Ben Mlouka,^{1,2} L. Coquet,^{1,2} J. Hardouin,^{1,2} T. Jouenne,¹ P. Cosette,^{1,2}

¹Laboratory Polymères, Biopolymères, Surfaces (UMR 6270 CNRS), University of Rouen Normandy

² INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRaLeS-PISSARO, University of Rouen Normandy

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen involved in a large number of nosocomial infections.

- Cause of mortality in cystic fibrosis patients due to its high capacity to form biofilm



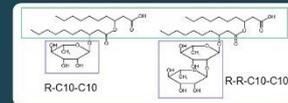
- Production of rhamnolipids that are one of the many essential actors in biofilm formation

- High resistance of bacterial biofilms to the host immune system and also to antibiotics ⁽¹⁾

- Persistence in hostile environments causing recurrent infections

Rhamnolipids

- Crucial for the maintenance of the biofilm architecture, in particular the nutritional channels located within the biofilm ⁽²⁾. An overproduction of rhamnolipids would induce biofilm dispersion ⁽²⁾.
- Family of glycopeptides composed of one or two fatty acid tails and rhamnose groups
- Their secretion in the external environment is still poorly understood



The "Biofilm-associated-cluster" (BAC)

The BAC of *P. aeruginosa* is a system composed of 4 proteins : PA3729, PA3730, PA3731 and PA3732.

The 4 genes encoding these proteins are organized in an operon :



According to previous results ⁽³⁾, *P. aeruginosa* PAO1 strain mutated on the *pa3731* gene exhibits a decrease of :

- swarming motility
- biofilm formation
- rhamnolipid secretion

Objective

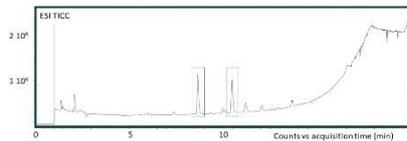
To characterize more precisely the involvement of this BAC system in rhamnolipid secretion in *P. aeruginosa* PA14



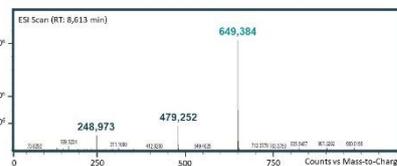
In this work, 5 strains have been used, the collection strain, PA14, and all the mutants for the four genes constituting the BAC system. These strains have been tested for their ability to produce rhamnolipids using specific extraction and dedicated mass spectrometry experiments.

Results

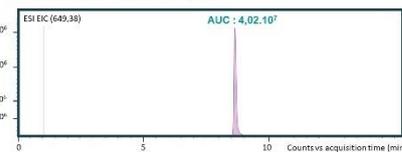
- On the TICC, two major species are observed (green boxes).



- The m/z of each rhamnolipid is searched among all the MS scans. Below, the m/z = 649.384 corresponds to the rhamnolipid R-C10-C10 (confirmed by MS2).

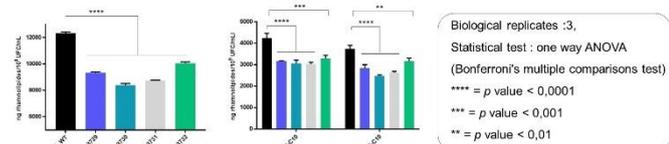


- Using the Extracted-Ion-Chromatogram (EIC) method, the specific intensity of each successive MS scan is summed to obtain the area under the curve of the EIC peak.



Thanks to a standard curve, the EIC peak area is converted into quantity.

In total, about 20 rhamnolipids were identified and quantified in each strain. The quantities of each rhamnolipid were summed to obtain the total quantity of rhamnolipid (left graph).



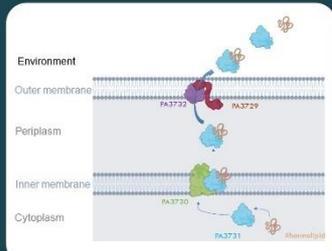
- Q-TOF analysis showed that rhamnolipids were significantly less abundant in the culture supernatant of the four BAC mutants strains compared to the wild-type strain.
- In particular, the amount of major rhamnolipids (R-R-C10-C10 and R-C10-C10) were the most impacted by the BAC mutation (right graph).

Functional hypothesis

In this study we tested the ability of the BAC mutants to secrete rhamnolipids in their surrounding environment by a label-free quantitative approach.

The results showed that the BAC system play a role in the secretion of rhamnolipids by the bacterium.

A hypothesis of the mechanism of rhamnolipid secretion by the BAC system is shown on the side.



Contact : lisa.wallart@univ-rouen.fr
pascal.cosette@univ-rouen.fr

Acknowledgments : this work is supported by Rouen Normandy University and Normandy region.

References :
(1) K. Lee & Yoon, 2017, J. Microbiol. Biotechnol.
(2) Davey et al., 2003, J. of Bacteriology
(3) Macé et al., 2008, PLoS ONE



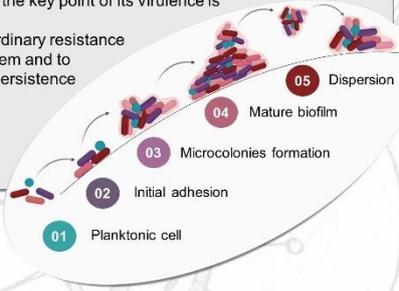
A new potential target to avoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

L. Wallart,¹ MA. Ben Mlouka,^{1,2} L. Coquet,^{1,2} J. Hardouin,^{1,2} H. Le,^{1,2} T. Jouenne,¹ P. Cosette,^{1,2}

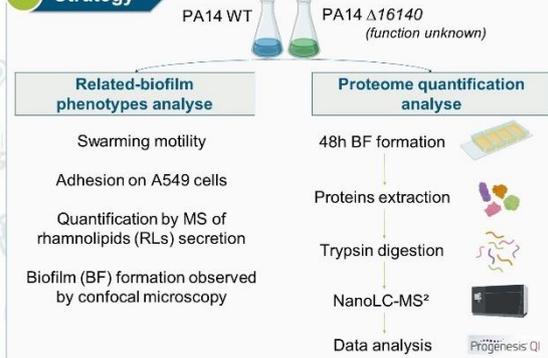
¹Polymères, Biopolymères, Surfaces (UMR 6270 CNRS), University of Rouen Normandy, Normandy University, 76000 Rouen, France
²INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRaCLeS-PISSARO, University of Rouen Normandy, Normandy University, 76000 Rouen, France

01 Introduction

P. aeruginosa is a human opportunistic pathogen involved in a large number of nosocomial infections and a major cause of mortality in cystic fibrosis patients. One of the key point of its virulence is its biofilm lifestyle.⁽¹⁾ Biofilms have an extraordinary resistance to the host immune system and to antibiotics leading to a persistence of the infection. It is therefore crucial to **identified new targets to avoid biofilm formation.**



02 Strategy



03 Impact of the 16140 mutation on the biofilm formation

Swarming motility

Swarming motility allows *P. aeruginosa* to move across surfaces. **The swarming motility is reduced in the $\Delta 16140$.**

Adhesion on A549 cells

Adhesion to a surface (biotic or abiotic) is a crucial step in biofilm formation. **The $\Delta 16140$ showed a reduced ability to adhere on A549 cells compared to the WT.**

Rhamnolipids secretion

RLs participate to the formation of microcolonies and to nutrients transport. **The 16140 gene mutation induced a diminished secretion of RLs.**

Biofilm formation

Mature biofilm disperses to colonize the surrounding environment, forming a thick and rigid bacterial layer. **The 16140 gene mutation impacted biofilm formation.**

04 First investigation by quantitative proteomic approach

The analysis of peptide distribution reveals two distinct populations.

- WT
- $\Delta 16140$

In total, **1702** proteins were identified
38 proteins upregulated in the $\Delta 16140$ biofilm
167 proteins upregulated in the WT biofilm

We identified 5 interesting proteins (in red, with 3 proteins with $p < 0,05$ and $\text{fold} > 1,5$) which are in interaction (see on the right). Within these proteins, elastase **LasB** promotes BF formation partly through RLs-mediated regulation.⁽²⁾

05 To conclude

Antibiotic resistance and persistence in the tissue linked to the biofilm lifestyle complicate the treatment of *P. aeruginosa* infections. The scientific community is confronted to a real challenge to solve this public health problem.

Our work concerns the PA14_16140 protein defined as a hypothetical protein (unknown function). The mutation on PA14_16140 negatively impacts the different steps of biofilm formation. Moreover, the proteomic study showed a set of proteins differentially regulated between both strains in biofilm condition. Although it is still difficult to assign a function, PA14_16140 would play a role in virulence and in particular in the biofilm formation.

Further studies will allow us to better understand the function of this protein which could become a potential target in the fight against *P. aeruginosa* biofilm.

Contacts : lisa.wallart@univ-rouen.fr ; pascal.cosette@univ-rouen.fr

References :
 (1) K. Lee & Yoon, 2017, J. Microbiol. Biotechnol.
 (2) H. Raouia et al., 2020, Archives of Microbiology

Acknowledgments : this work is supported by Rouen Normandy University and Normandy region. Europe gets involved in Normandy with the European Regional Development Fund (ERDF).

Résumé

L'émergence et la propagation des bactéries multirésistantes aux antibiotiques est devenue une problématique majeure de santé publique. En particulier, *P. aeruginosa* fait partie des pathogènes opportunistes humains pour lesquels il devient urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. *P. aeruginosa* est un germe qui cible préférentiellement les individus dont le système immunitaire est affaibli. Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose, d'un cancer, du SIDA, ou hospitalisés sur une longue durée sont des sujets à haut risque d'infection à *P. aeruginosa*. Chez ces patients, ces infections sont associées à une forte morbidité et mortalité, en raison de la persistance et de la résistance des bactéries colonisant les tissus de l'hôte sous forme de biofilms.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans l'objectif de découvrir de nouvelles cibles pour le design de futurs traitements novateurs. Je décris dans ce manuscrit les derniers éléments de caractérisation du système BAC (pour « Biofilm Associated Cluster »), qui nous permettent de l'envisager comme un système Psp original. Ce système est ainsi constitué de 6 protéines codées par l'opéron *bacABCDEF*. L'expression de cet opéron se ferait en réponse à des stimuli et serait sous la dépendance du facteur sigma σ^{54} et du système à deux composants Gac/Rsm. La structure de BacA (protéine présentant un domaine DUF2170), nouvellement élucidée, est homologue à celle de protéines chaperonnes du SST3 suggérant que BacA serait impliquée dans la régulation de l'expression de *bacABCDEF*. La protéine BacB est quant à elle un homologue structural des protéines PspA et Vipp1 supposant que le système BAC serait impliqué dans la protection membranaire sous l'action d'un stress extra-cytoplasmique encore inconnu. La protéine BacD semble être une flotilline, protéine « échafaudage » connue pour résider dans les microdomaines fonctionnels, aussi appelés lipid rafts.

Mots-clés : *P. aeruginosa*, protéomique, cristallographie, bio-informatique, biofilm, système Psp, protection membranaire, stress extra cytoplasmique, lipid rafts

Abstract

The emergence and spread of bacteria that are multi-resistant to antibiotics has become a real public health concern. In particular, *P. aeruginosa* is one of the major human opportunistic pathogens for which it is urgent to develop new therapeutic strategies. *P. aeruginosa* is a microorganism that preferentially targets immuno-compromised individuals. Thus, patients suffering from cystic fibrosis, cancer, AIDS, or hospitalized for a long period are subjects at high risk of *P. aeruginosa* infection. In these patients, these infections are associated with high morbidity and mortality, due to the persistence and resistance of bacteria colonizing host tissues most often within biofilms.

My thesis work is part of the objective of discovering new targets for the design of future innovative treatments. In this manuscript I describe the latest elements of characterization of the BAC system (for "Biofilm Associated Cluster"), which allow us to consider it as an original Psp system. This system is thus made up of 6 proteins encoded by the *bacABCDEF* operon. The expression of this operon would occur in response to stimuli and would be dependent on the sigma factor σ^{54} and the Gac/Rsm two-components system. The structure of BacA (protein presenting a DUF2170 domain), newly elucidated, is homologous to that of T3SS chaperone proteins suggesting that BacA is involved in the regulation of *bacABCDEF* expression. The BacB protein is a structural homolog of the PspA and Vipp1 proteins, suggesting that the BAC system is involved in membrane protection under the action of a yet unknown extra-cytoplasmic stress. The BacD protein appears to be a flotillin, a "scaffolding" protein known to reside in functional membrane microdomains, also called lipid rafts.

Keywords : *P. aeruginosa*, proteomics, crystallography, bioinformatics, biofilm, Psp system, membrane protection, extracytoplasmic stress, lipid rafts