

CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ET
STAPHYLOCOCCUS AUREUS LORS D'INFECTIONS PULMONAIRES EN FIBROSE
KYSTIQUE

par

Guillaume Millette

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, février 2019

Le 23 février 2019

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Guillaume Millette
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeure Pascale B. Beaugard

Évaluatrice interne

Département de biologie

Professeur Sébastien Rodrigue

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

2 Les complications les plus importantes retrouvées en fibrose kystique sont les infections
3 pulmonaires chroniques. *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les deux
4 microorganismes les plus prévalents. Malgré leur co-isolément fréquent des poumons de
5 patients, *P. aeruginosa* est antagoniste envers *S. aureus in vitro* et inhibe sa croissance; ces
6 pathogènes ne devraient donc vraisemblablement pas arriver à causer des infections mixtes
7 comme ils le font. Il semble donc y avoir une incohérence entre les observations cliniques et
8 celles effectuées dans le cadre de modèles expérimentaux au laboratoire. En effet, des co-isolats
9 cliniques ayant persisté dans le temps lors d'infections mixtes ne démontrent pas l'antagonisme
10 typiquement décrit. Les interactions des co-isolats cliniques ont donc été étudiée dans le cadre
11 de mes travaux de maîtrise. Deux modèles de co-culture *in vitro* ont été établis afin de
12 caractériser les isolats étudiés. Dans ces modèles, les co-isolats ont démontré une absence ou
13 une diminution de leur antagonisme, comparativement aux souches prototypiques. Par la suite,
14 un modèle d'infection pulmonaire animal a été établi afin de vérifier leur interaction dans un
15 contexte plus proche de la condition des patients atteints de la fibrose kystique. Étonnamment,
16 les co-isolats comme les souches antagonistes ont accentué la colonisation de *S. aureus*. Par
17 l'étude de plusieurs infections expérimentales mixtes causées par *P. aeruginosa* et *S. aureus*,
18 nous avons observé que plus l'infection des poumons par *P. aeruginosa* est importante, plus la
19 colonisation par *S. aureus* semble être facilitée. Bien qu'aucun facteur de virulence spécifique
20 de *P. aeruginosa* ni les facteurs transcriptionnels les plus importants à la virulence de *S. aureus*
21 n'aient été identifiés comme explication à ce phénomène, la surexpression des protéines
22 eucaryotes ICAM-1 et ITGA-5 par *P. aeruginosa* pourraient être impliquée dans l'adhésion et
23 l'internalisation cellulaire de *S. aureus*. Ainsi, *P. aeruginosa* pourrait modifier l'environnement
24 *in vivo* d'une façon bénéficiant à *S. aureus*. Cette étude donne une première explication à la co-
25 colonisation fréquente de ces deux bactéries pathogènes dans le contexte des infections
26 pulmonaires chez les sujets fibrose kystique.

27 **Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, infection mixte, interaction
28 polymicrobienne, fibrose kystique.

29

REMERCIEMENTS

31 J'aimerais remercier mon directeur de recherche François Malouin. Au cours de mes stages et
32 de mes travaux de maîtrise, j'ai toujours eu une excellente relation avec lui. J'apprécie la
33 confiance qu'il a eu en moi au cours des dernières années; il s'est toujours montré très ouvert
34 aux nouvelles idées que j'apportais dans mes différents projets et m'a accordé beaucoup de
35 liberté et d'autonomie pour effectuer mes travaux. Enfin, grâce à lui, j'ai su saisir de nombreuses
36 opportunités afin d'enrichir mon expérience professionnelle, notamment le congrès
37 international de l'ECCMID où j'ai eu la chance de partager le fruit de mes efforts et de mes
38 travaux.

39 J'aimerais également remercier mes conseillers, Pr. Pascale B. Beauregard et Pr. Sébastien
40 Rodrigue, pour leurs conseils et leur appui au cours de ma maîtrise.

41 Je remercie aussi tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer. Je crois
42 fermement que nos discussions scientifiques et notre entraide nous a permis à tous de nous
43 dépasser et de mieux progresser.

44 Enfin, j'aimerais remercier ma famille pour leur soutien et support moral au cours de ces deux
45 dernières années.

TABLE DES MATIÈRES

47	SOMMAIRE.....	iv
48	REMERCIEMENTS	vi
49	TABLE DES MATIÈRES.....	vii
50	LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
51	LISTE DES TABLEAUX	xii
52	LISTE DES FIGURES	xiii
53	CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
54	1.1 La fibrose kystique.....	1
55	1.2 Pathogènes prévalents et infections pulmonaires en fibrose kystique.....	2
56	1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> , virulence et pathogénèse	4
57	1.3.1 Le phénotype SCV de <i>S. aureus</i>	10
58	1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , virulence et pathogénèse.....	12
59	1.5 Interactions polymicrobiennes	17
60	1.6 Contexte, hypothèse et objectifs	19
61	CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	21
62	2.1 Introduction de la publication	21
63	2.2 Article scientifique.....	23
64	2.2.1 Abstract	23
65	2.2.2 Introduction	24
66	2.2.3 Materials and Methods	27
67	Ethics statement.....	27

68	Bacterial strains and growth conditions	27
69	Growth kinetics experiments	30
70	Co-culture Petri model	30
71	Mouse lung mono- and co-infection model.....	31
72	MPO activity	32
73	RNA isolation and RT-qPCR	32
74	2.2.4 Results	34
75	Clinical co-isolates show different levels of antagonism <i>in vitro</i>	34
76	<i>P. aeruginosa</i> increases <i>S. aureus</i> colonization in a mouse lung infection model,	
77	regardless of their type of interactions <i>in vitro</i>	36
78	Searching for <i>P. aeruginosa</i> virulence-associated factors helping <i>S. aureus</i> colonization	
79	37
80	Searching for <i>S. aureus</i> virulence-associated factors promoting its own colonization	
81	during co-infection	39
82	<i>P. aeruginosa</i> improves <i>S. aureus</i> colonization in a dose-dependant manner	40
83	The contribution of <i>P. aeruginosa</i> to <i>S. aureus</i> colonization is independent of	
84	inflammation.....	43
85	<i>P. aeruginosa</i> induces the overexpression of known <i>S. aureus</i> cell surface receptors .	45
86	2.2.5 Discussion	46
87	2.2.6 Acknowledgments.....	50
88	2.2.7 References	50
89	2.2.8 Supplemental material.....	62
90	CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	66
91	3.1 Rappel des résultats	66
92	3.2 Perspectives	67

93	3.3 Conclusion	70
94	BIBLIOGRAPHIE	71
95		

- 97 FK : Fibrose kystique
- 98 CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
- 99 SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline
- 100 FEV1 : *Forced expiratory volume in 1 second*
- 101 WT : *Wild-type*
- 102 AIP : *Auto-inducing peptide*
- 103 QS : *Quorum-sensing*
- 104 Agr : *Accessory gene regulator*
- 105 PSM : *Phenol-soluble modulins*
- 106 TSST : *Toxic shock syndrome toxin*
- 107 IL : Interleukine
- 108 TNF : *Tumor necrosis factor*
- 109 PIA : *Polysaccharide intercellular antigen*
- 110 ICA : Adhésion intercellulaire
- 111 SpA : Protéine A
- 112 Bap : Protéine associée au biofilm
- 113 FnBP : *Fibronectin-binding protein*
- 114 SCV : *Small-colony variant*
- 115 ATP : Adénosine triphosphate

- 116 AHL : *Acetyl homoserine lactone*
- 117 AQ : *2-alkyl-4-quinolone*
- 118 HHQ : *2-heptyl-4-hydroxyquinolone*
- 119 PQS : *2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone*
- 120 OdDHL : *N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone*
- 121 BHL : *N-butyryl-L-homoserine lactone*
- 122 T3SS : *Système de sécrétion de type III*
- 123 AMPc : *Adénosine monophosphate cyclique*
- 124 SOD1 : *Superoxyde dismutase*
- 125 COX-2 : *Cyclooxygénase-2*
- 126 HQNO : *4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide*
- 127 SNP : *Single nucleotide polymorphism*

128

LISTE DES TABLEAUX

129 CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Table 1. *P. aeruginosa* and *S. aureus* reference and mutant strains 28

130

132 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

- Figure 1. Comparaison de l'évacuation mucociliaire entre des voies respiratoires saines et celles de patients FK 2
- Figure 2. Prévalence des infections respiratoires chez les patients FK de 2013 à 2017 4
- Figure 3. Contrôle du système de quorum-sensing *agr* chez *S. aureus* 6
- Figure 4. Caractéristiques phénotypiques de *S. aureus* prototypique et du SCV 9
- Figure 5. Système du quorum-sensing chez *P. aeruginosa* 13
- Figure 6. Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* 14
- Figure 7. L'interaction *in vitro* entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* 18

133 CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

- Figure 1. Growth kinetics and bacterial viability of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in mono or co-cultures 35
- Figure 2. Mouse pulmonary mono or co-infections with *S. aureus* and *P. aeruginosa*. 37

Figure 3.	Mouse pulmonary mono or co-infections with <i>S. aureus</i> CF54-L and <i>P. aeruginosa</i> PA14 and mutants	38
Figure 4.	Mono or mixed mouse pulmonary infections with <i>S. aureus</i> virulence mutants and <i>P. aeruginosa</i>	40
Figure 5.	Compilation of mixed mouse pulmonary infections with <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	42
Figure 6.	MPO activity of lungs mono or co-infected with <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	44
Figure 7.	Relative expression of cellular ICAM-1 (A) and ITGA-5 (B) genes in lung tissues during mono or co-infections with <i>S. aureus</i> CF54A-L and <i>P. aeruginosa</i> PA14	46
Figure S1.	Growth kinetics and bacterial viability of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i> in mono or co-cultures	62
Figure S2.	Mouse pulmonary mono or co-infections with <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	63
Figure S3.	Compilation of mixed mouse pulmonary infections with <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	64

134 CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Figure 8.	Arbre phylogénétique des isolats cliniques et colonisation de <i>S. aureus</i> en fonction de différents clones séquentiels de <i>P. aeruginosa</i>	69
-----------	---	----

136

CHAPITRE 1

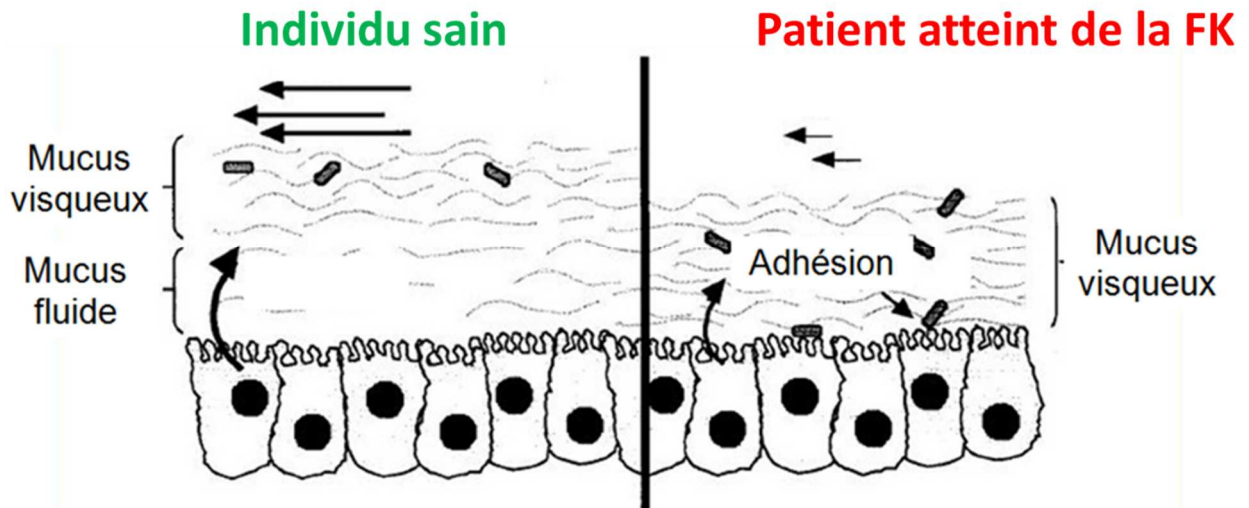
137

INTRODUCTION GÉNÉRALE

138 1.1 LA FIBROSE KYSTIQUE

139 La fibrose kystique (FK) est la maladie génétique récessive mortelle la plus répandue chez les
140 enfants et les jeunes adultes canadiens. Ainsi, un enfant sur 3600 qui naît au Canada en serait
141 atteint. Plus de 4300 canadiens touchés par cette maladie fréquentent des cliniques spécialisées
142 en FK (Cystic Fibrosis Canada, 2018). Une mutation dans le gène CFTR (*cystic fibrosis*
143 *transmembrane conductance regulator*) entraîne cette maladie autosomale récessive, qui affecte
144 plusieurs systèmes physiologiques présentant du tissu épithélial muqueux, notamment le tract
145 gastrointestinal (incluant le pancréas, le foie et la vésicule biliaire), les glandes salivaires et les
146 organes reproducteurs mâle et femelle. Toutefois, les répercussions les plus sévères affectent le
147 système respiratoire (Kreda, Davis and Rose, 2012). Le rôle du canal CFTR est de pomper les
148 ions chlore du milieu intracellulaire vers celui extracellulaire, à travers la membrane des cellules
149 épithéliales glandulaires produisant le mucus. L'hypothèse la plus acceptée pour expliquer
150 l'impact de la défectuosité de ce gène est que le transport du chlore contrôle partiellement le
151 mouvement d'eau et, conséquemment, influence la production d'un mucus normal et adéquat
152 (Folkesson *et al.*, 2012; Kreda, Davis and Rose, 2012). Le déficit en chlore crée un gradient
153 osmotique, qui à son tour provoque la déshydratation de la surface des voies respiratoires; le
154 mucus devient alors épais et collant (Ratjen, 2009; Kreda, Davis and Rose, 2012). Le mucus,
155 n'étant plus efficacement évacué, forme un milieu propice à la colonisation bactérienne (**Figure**
156 **1**). En effet, le mécanisme d'évacuation mucociliaire est inhibé, les macrophages vacuolaires
157 sont bloqués (Marshall and Carroll, 1991; Carnoy *et al.*, 1993, 1994) et le mucus riche en
158 nutriments favorise la croissance des microorganismes pathogènes (Palmer *et al.*, 2005;
159 Sriramulu *et al.*, 2005). Ainsi, les infections chroniques sont responsables de la majorité des

160 décès liés à la FK, c'est-à-dire entre 80 et 95% de tous les patients (Lyczak, Cannon and Pier,
161 2002). L'âge médian des individus atteints est limité à environ 51 ans.

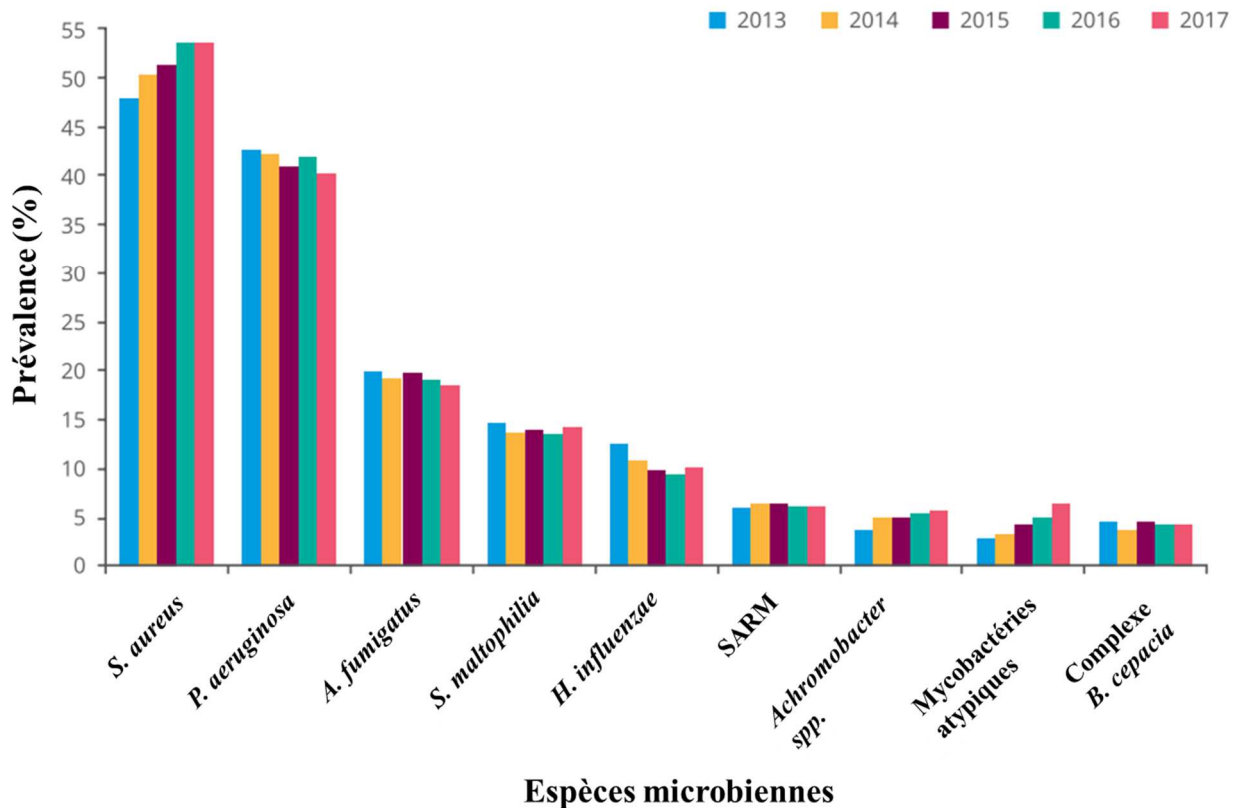


162
163 **Figure 1. Comparaison de l'évacuation mucociliaire entre des voies respiratoires saines et**
164 **celles de patients FK. Adapté de Lyczak *et al.* 2002.**

165 1.2 PATHOGÈNES PRÉVALENTS ET INFECTIONS PULMONAIRES EN FIBROSE 166 KYSTIQUE

167 En raison de la production d'un mucus anormal et pour les différentes raisons physiologiques
168 expliquées plus haut, les patients FK sont particulièrement susceptibles aux infections
169 bactériennes chroniques. Ainsi, de nombreux pathogènes arrivent à coloniser leurs voies
170 respiratoires, mais *Staphylococcus aureus* (incluant le *S. aureus* résistant à la méthicilline, i.e.
171 SARM) et *Pseudomonas aeruginosa* sont particulièrement prévalents avec 59.6% et 40.2% des
172 patients étant infectés (**Figure 2**) (Cystic Fibrosis Canada, 2018). Ces deux pathogènes
173 s'établissent selon une tendance chronologique bien précise : *S. aureus* colonise typiquement
174 les patients les plus jeunes, puis sa prévalence décline à l'âge adulte. *P. aeruginosa*, au contraire,
175 infecte en général peu les enfants mais devient le pathogène dominant chez les adultes. Malgré
176 leur ordre séquentiel d'apparition, ces deux microorganismes sont souvent co-isolés des
177 poumons d'un même patient (Hubert *et al.*, 2013). Alors que les mono-infections à *P.*

178 *aeruginosa* détériorent sans contredit la santé des patients, contribuant à leur morbidité et à leur
179 mortalité (Sadikot *et al.*, 2005b; Harun *et al.*, 2016), l'impact des mono-infections à *S. aureus*
180 est controversé; il n'est pas clair si ce pathogène aggrave à lui seul l'état pulmonaire des patients
181 souffrant de la FK (Junge *et al.*, 2016; Limoli *et al.*, 2016). Toutefois, son influence pourrait
182 aller au-delà de l'effet de sa virulence directe sur les poumons mais plutôt agir sur la colonisation
183 de *P. aeruginosa* et sur sa virulence. En effet, il a été démontré que *S. aureus*, lorsqu'il infecte
184 les poumons en premier dans un modèle d'infection animal, crée des abcès et des lésions qui
185 favorise l'arrivée subséquente de *P. aeruginosa* (Cigana *et al.*, 2018). Ainsi, ce modèle mime le
186 même genre d'infections séquentielles que celles retrouvées en FK. Donc, même si la virulence
187 de *S. aureus* n'affecte pas aussi durement le poumon que *P. aeruginosa*, *S. aureus* demeure un
188 pathogène dangereux qui doit être considéré dans le choix du traitement. En plus de ce constat,
189 plusieurs études ont associé les co-infections *P. aeruginosa* – *S. aureus* à un déclin de la santé
190 chez les patients. Les patients souffrant d'infection mixte ont une capacité respiratoire (FEV1)
191 diminuée et ont davantage d'exacerbations pulmonaires (Rosenbluth *et al.*, 2004; Hubert *et al.*,
192 2013; Limoli *et al.*, 2016); ces dernières sont extrêmement dommageables, car elles infligent
193 des dégâts tissulaires irréversibles (Parkins, Rendall and Elborn, 2012). D'autres modèles
194 d'infection chez la souris, notamment de plaies et d'otites (Pastar *et al.*, 2013; Yadav *et al.*,
195 2017), ont aussi démontrés que les infections mixtes sont plus dommageables que celles causées
196 par un seul des deux pathogènes. En résumé, les co-infections *S. aureus* – *P. aeruginosa* ont un
197 impact important sur la santé des patients, particulièrement ceux atteints de la FK.



198

199 **Figure 2. Prévalence des infections respiratoires chez les patients FK de 2013 à 2017.**

200 Adapté de Cystic Fibrosis Canada 2018.

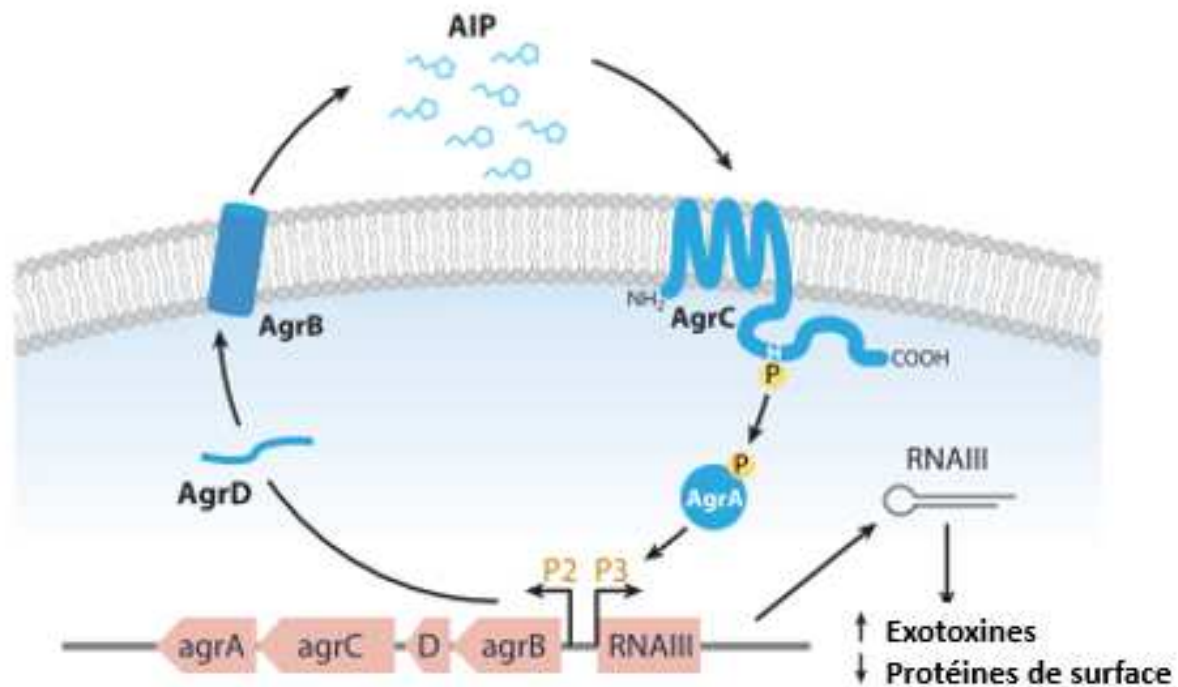
201 **1.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS, VIRULENCE ET PATHOGÉNÈSE**

202 *Staphylococcus aureus* est un coque Gram positif anaérobie facultatif. C'est un pathogène
 203 opportuniste, c'est-à-dire qu'il profite des faiblesses et des brèches du système immunitaire pour
 204 provoquer différents types d'infections. On le retrouve notamment dans des infections de la
 205 peau, de plaies et bien sûr dans les voies respiratoires supérieures et inférieures (Otto, Steele-
 206 Mortimer and Subtil, 2014). Alors qu'un individu sain est normalement résistant aux infections
 207 à *S. aureus*, un patient atteint de la FK sera très susceptible à ses infections.

208 Plusieurs bactéries contrôlent la transcription de leur gène via la sécrétion de petites molécules
 209 de signalisation. Chez *S. aureus*, ces petites molécules, appelées peptides auto-inducteurs

210 (AIPs), régulent leur propre synthèse. Ainsi, une bactérie seule qui produira ces AIPs n'en
211 produirait pas suffisamment pour affecter la régulation et la transcription des gènes de synthèse
212 des AIPs. Toutefois, si la densité bactérienne augmente, il y aura plus de AIPs dans un
213 environnement restreint; ces AIPs activeront la production de plus de AIPs, ce qui amplifiera
214 encore davantage la synthèse de ces molécules; il s'agit alors d'une boucle d'auto-activation.
215 Lorsqu'elles atteignent une certaine quantité, elles sont suffisamment nombreuses pour
216 permettre la transduction d'un signal qui permettra l'activation d'autres gènes, notamment ceux
217 codant pour des facteurs de virulence (Fuqua, Winans and Greenberg, 1994). Ce genre de
218 système s'appelle quorum-sensing (QS).

219 *S. aureus* présente un système de QS très important pour sa virulence, appelé *accessory gene*
220 *regulator (agr)* (**Figure 3**). Les facteurs de virulence sous le contrôle du QS lui permettent
221 d'échapper aux défenses de l'hôte, d'adhérer aux cellules, de se disséminer dans les tissus et
222 dégrader les cellules afin de se nourrir et en guise de protection. En raison du coût énergétique
223 pour produire ces facteurs, il est crucial que les microorganismes synchronisent leur synthèse
224 de facteurs de virulence afin d'atteindre le but recherché selon le stade de l'infection. L'auto-
225 activation d'*agr* se produit de la manière suivante : Le peptide AgrD est encodé par son gène
226 homonyme, sous le contrôle du promoteur P2. AgrD est modifié en N-terminal et en C-terminal
227 respectivement par SpsB et AgrB, afin de produire un anneau thiolactone à queue, c'est-à-dire
228 l'AIP fonctionnel qui est alors sécrété. Il se lie ensuite au récepteur transmembranaire AgrC,
229 induisant la phosphorylation du domaine HPK cytoplasmique. Le groupement phosphate est
230 ensuite transféré à AgrA, qui à son tour active les deux promoteurs *agr* P2 et P3. Le promoteur
231 P2 est responsable de la transcription de tous les facteurs *agr* mentionnés précédemment; la
232 boucle est bouclée et les AIPs activent de plus en plus leur propre synthèse. Le promoteur P3,
233 quant à lui, permet la transcription de RNAIII, qui est l'effecteur du système. Ainsi, RNAIII est
234 responsable de la surexpression ou répression de plusieurs facteurs de virulence (Novick and
235 Geisinger, 2008).



236

237 **Figure 3. Contrôle du système de quorum-sensing *agr* chez *S. aureus*.** Adapté de Novick et
 238 Geisinger 2008.

239 Lorsque *S. aureus* prototype infecte son hôte, la production de ses facteurs de virulence suit un
 240 ordre chronologique. À faible densité bactérienne, des adhésines et protéines de défense contre
 241 le système immunitaire de l'hôte sont produites en premier permettant ainsi à *S. aureus* de
 242 s'établir dans les tissus. Plus *S. aureus* arrive à se diviser, à augmenter sa population et du fait
 243 même, produire davantage d'AIPs, sa production de protéines passe aux hémolysines, protéines
 244 cytotoxiques, protéases, leucocidines et autres facteurs de virulence agressifs. Il y a donc un
 245 changement transcriptionnel au fur et à mesure que *S. aureus* passe de la colonisation à la phase
 246 d'agression et de dissémination (Novick, 2003).

247 Lorsque *S. aureus* s'est établi dans les tissus, il possède un vaste répertoire de toxines afin de
 248 maintenir sa croissance et s'évader du système immunitaire. Il y a d'abord les toxines
 249 endommageant les membranes, comme l'hémolysine- α , la leucocidine de Pantou-Valentine et

250 les leucocidines LukDE et LukAB. Les PSMs (*phenol-soluble modulins*) ont été identifiées
251 comme étant des effecteurs permettant la lyse des neutrophiles à la suite de leur phagocytose.
252 Chez certaines souches, le superantigène TSST (*toxic shock syndrome toxin*) module la réponse
253 immunitaire de l'hôte par la stimulation de la production d'IL-1 (interleukine-1), IL-2, TNF- α
254 (*tumor-necrosis factor α*) et d'autres cytokines. Les protéases sécrétées par *S. aureus* dégradent
255 les protéines de l'hôte. Notamment, l'aureolysine, la glutamyl endopeptidase et les protéases
256 cystéine staphopaine A et B interfèrent avec le système du complément, permettant à *S. aureus*
257 de se soustraire à ce mécanisme immunitaire (Otto, Steele-Mortimer and Subtil, 2014).

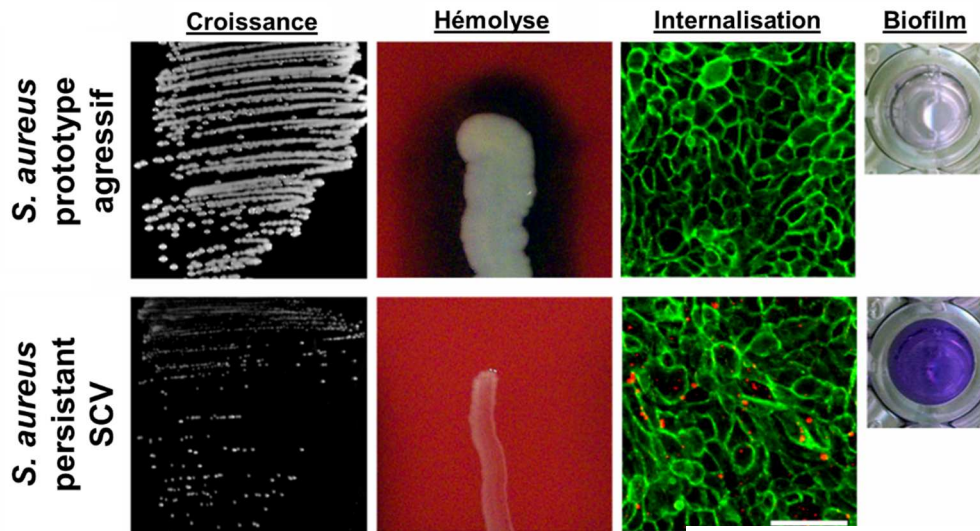
258 Un autre aspect important de la virulence de *S. aureus* est son habilité à former du biofilm, lui
259 permettant d'éviter la phagocytose médiée par le système immunitaire et au traitement
260 antibiotique. Ainsi, le biofilm consiste en une communauté microbienne enchâssée dans une
261 matrice de polymères de sucres extracellulaires, d'acides nucléiques et de protéines, permettant
262 l'adhésion aux tissus biologiques ainsi qu'aux matériaux et implants médicaux tels les cathéters.
263 L'une des molécules principales du biofilm est le *polysaccharide intercellular antigen* (PIA).
264 Le PIA est produit par le locus d'adhésion intercellulaire (*ica*), qui est surexprimé en condition
265 anaérobique, de manière analogue à l'environnement retrouvé dans le biofilm. D'autres facteurs
266 environnementaux peuvent réguler *ica*, soit le glucose, l'éthanol, l'osmolarité, la température et
267 certains antibiotiques. Malgré l'importance de *ica* dans la production de biofilm, d'autres
268 mécanismes permettent sa synthèse. Ainsi, des isolats cliniques présentant des mutations dans
269 l'opéron *ica* produisait toujours du biofilm autant *in vitro* que *in vivo*. Toutefois, la protéine A
270 (SpA) se révélait désormais essentielle à la formation de biofilm. Un test de complémentation
271 d'un double mutant *spa* et *ica* avec du SpA exogène permettait à la souche de retrouver son
272 activité productrice de biofilm (Merino *et al.*, 2009). De plus, chez certaines souches, la
273 catégorie de protéines associées au biofilm (Bap) confère également la capacité de produire du
274 biofilm de manière indépendante de PIA, grâce à l'agrégation cellulaire qu'elles confèrent. En
275 plus de ces protéines et de ces polysaccharides, l'ADN extracellulaire joue également un rôle.
276 Différentes expériences ont démontré que l'ajout de DNase engendrait un biofilm immature et
277 on en a même fait un usage clinique concluant dans un modèle *in vivo* (Archer *et al.*, 2011). La
278 régulation de la production de biofilm est, entre autres, contrôlée par *agr* et SigB (Archer *et al.*,

279 2011; Mitchell *et al.*, 2013a). Ainsi, *agr* a été démontré comme diminuant l'expression de gènes
280 associés à l'adhérence, nécessaire au biofilm. Au contraire, SigB induit l'expression de
281 *clumping factor*, de protéines d'adhésion comme les FnBPs et de coagulase, tous des facteurs
282 nécessaires aux stages initiaux de production de biofilm. À l'opposé, les facteurs permettant la
283 dispersion du biofilm (hémolysines, entérotoxines, protéases, etc.) sont tous négativement
284 contrôlés par SigB.

285 *S. aureus* se présente sous deux phénotypes différents, chacun ayant une stratégie de virulence
286 différente. Le premier est celui *wild-type* (WT); il s'agit du *S. aureus* prototype. Parmi ses
287 principales caractéristiques, notons qu'il a une croissance rapide en culture en laboratoire, il
288 produit un large éventail de facteurs de virulence, persiste peu dans le milieu intracellulaire de
289 cellules phagocytaires non-professionnelles et produit peu de biofilm (Mitchell, Grondin, *et al.*,
290 2011; Mitchell *et al.*, 2012) (**Figure 4**). Ainsi, sous cette forme, *S. aureus* adopte un
291 comportement plus agressif.

292

293



294

295 **Figure 4. Caractéristiques phénotypiques de *S. aureus* prototypique et du SCV.** Adapté de
296 Mitchell *et al.* 2011 et 2012.

297 Les particularités phénotypiques du prototype et du SCV sont démontrées pour 4 traits distincts.
298 La colonne de gauche intitulée « Croissance » montre la taille des colonies de *S. aureus* à la
299 suite d'une croissance de 16h à 35 °C sur gélose. La colonne suivante, nommée « Hémolyse »,
300 montre l'activité hémolytique de *S. aureus* après 24h à 35 °C sur une gélose supplémentée en
301 sang de cheval 5%. La troisième colonne, nommée « Internalisation », indique la capacité
302 d'internalisation cellulaire de *S. aureus* dans un modèle d'infection cellulaire *in vitro* de 24h à
303 35 °C. *S. aureus* est indiqué en rouge, alors que les cellules sont de couleur verte. La dernière
304 colonne à droite correspond à la quantité de biofilm produit après une incubation de 24h à 35
305 °C; le surnageant est retiré, le biofilm est lavé au PBS puis coloré au crystal violet.

306 Le deuxième phénotype que *S. aureus* peut revêtir est celui du *small-colony variant* (SCV).
307 Contrairement à la souche prototypique, le SCV démontrera une croissance beaucoup plus lente
308 en laboratoire, ne produira que très peu de facteurs de virulence mais sera toutefois supérieur
309 dans sa capacité à s'internaliser dans les cellules de l'hôte et dans sa production de biofilm
310 (Mitchell, Grondin, *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2012) (**Figure 4**). Ainsi, plutôt que d'être un
311 pathogène exprimant un arsenal de facteurs de virulence, il est plutôt adapté pour survivre et

312 persister lors d'infections chroniques, comme la FK. On le retrouve également dans des cas
313 d'ostéomyélite et d'infections de prothèses orthopédiques.

314 1.3.1 LE PHÉNOTYPE SCV DE *S. AUREUS*

315 Le phénotype du SCV est dû à des particularités biochimiques, les deux principales étant une
316 chaîne respiratoire altérée ou biosynthèse de la thymidine déficiente. En ce qui concerne la
317 chaîne de transport d'électrons, les mutations les plus courantes sont celles ciblant la
318 biosynthèse de l'hémine et du ménadione, tous deux des éléments essentiels des cytochromes,
319 les unités permettant le transport des électrons afin de produire de l'ATP (Proctor *et al.*, 2006).
320 La chaîne de transport d'électrons est l'une des sources principales d'énergie dans la cellule;
321 chez le SCV, son défaut entraînera une diminution importante de de la production d'ATP,
322 causant une réduction de sa croissance (d'où le terme *small-colony variant*). Dans le cas du SCV
323 auxotrophe pour la biosynthèse de la thymidine, il est mal compris comment cette déficience
324 engendre ce phénotype. Un lien a été établi avec son homologue auxotrophe pour la chaîne
325 respiratoire; l'acquisition de thymidine exogène nécessite un potentiel membranaire, une
326 caractéristique aussi altérée chez les SCVs de la chaîne respiratoire (Proctor *et al.*, 2006).

327 Contrairement au *S. aureus* prototype, la virulence du SCV est principalement sous le contrôle
328 du facteur de transcription alternatif SigB et non pas Agr (Mitchell *et al.*, 2013a). En effet, chez
329 les souches prototypes, SigB est majoritairement exprimé lors de l'étape de colonisation et
330 d'adhésion de la bactérie au tissu. Ainsi, l'activité SigB module la formation de biofilm chez les
331 SCVs, est responsable de l'expression de l'adhésine *fnbA* et est requise pour la réplication
332 intracellulaire. Lorsque *S. aureus* se divise suffisamment, le système Agr se met en branle et
333 prend le dessus sur SigB; il y a alors production de facteurs de virulence. Or, chez le SCV, le
334 système Agr ne prend jamais le dessus sur SigB : L'hypothèse la plus couramment retenue pour
335 expliquer la différence dans l'expression de facteurs de virulence entre le SCV et la souche
336 prototype est que la croissance lente du SCV l'empêche d'atteindre la concentration minimale
337 d'AIP qui permettrait l'activation du système Agr et subséquentement des facteurs de virulence
338 associés.

339 Grâce à l'expression constitutive des protéines liant la fibronectine (FnBPs) tout au long de sa
340 croissance, le SCV colonise plus facilement les tissus de l'hôte. Ainsi, les FnBPs lient la
341 fibronectine, une glycoprotéine constituant la matrice extracellulaire et retrouvée à la surface de
342 plusieurs cellules eucaryotes. Or, à l'aide de ces protéines, *S. aureus* arrive à s'internaliser à
343 l'intérieur de cellules, où il sera à l'abri du système immunitaire et d'un éventuel traitement
344 antibiotique. Comme le SCV produit davantage de FnBPs que sa contrepartie prototypique, il
345 profite davantage de ce mécanisme d'évasion. De plus, le SCV est également beaucoup plus
346 tolérant et/ou résistant aux antibiotiques que la souche parente. Notamment, ils sont résistants
347 aux antibiotiques de la classe des aminosides, tel que la gentamicine et la tobramycine, cette
348 dernière étant commercialisée sous forme nébulisée pour le traitement d'infections pulmonaires
349 chroniques chez les patients FK (Mitchell, Gattuso, *et al.*, 2011). En effet, les aminosides
350 pénètrent dans les bactéries en suivant le gradient de protons. Or, les SCVs ont un gradient de
351 protons altéré; l'antibiotique ne parvient donc pas à pénétrer la bactérie et à atteindre sa cible
352 (i.e. le ribosome). En plus de ces résistances intrinsèques, les SCVs sont également tolérants à
353 plusieurs autres antibiotiques. Comme ces microorganismes produisent moins d'énergie, leur
354 métabolisme est beaucoup plus lent que celui des souches normales. Or, les antibiotiques
355 ciblent, de manière générale, des mécanismes qui sont actifs. Par exemple, la ciprofloxacine
356 cible l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase, qui sont nécessaires à la réplication de l'ADN; la
357 vancomycine cible le peptidoglycane de la paroi bactérienne et les aminosides inhibent la
358 synthèse protéique en se liant de manière covalente aux différentes sous-unités des ribosomes.
359 De ce fait, un SCV, ayant un métabolisme ralenti, répliquera aussi son ADN plus lentement, se
360 divisera plus lentement et produira moins de protéines. Le SCV sera donc moins efficacement
361 affecté par ces antibiotiques (Lalonde-Séguin *et al.*, données non-publiées).

362 Bien que les SCVs et les souches prototypes soient régulièrement présentées comme des entités
363 distinctes, la réalité n'est pas aussi simple. Ces deux phénotypes sont souvent transitoires, et ils
364 peuvent même être tous deux retrouvés dans le cadre d'une même infection. Par exemple, lors
365 de l'application d'un traitement à la tobramycine dans le cadre d'une infection pulmonaire, une
366 pression de sélection est appliquée sur *S. aureus*. Les SCVs qui apparaissent naturellement
367 survivent à l'antibiotique, alors que les prototypes sont éliminés. Lorsque le traitement est arrêté,

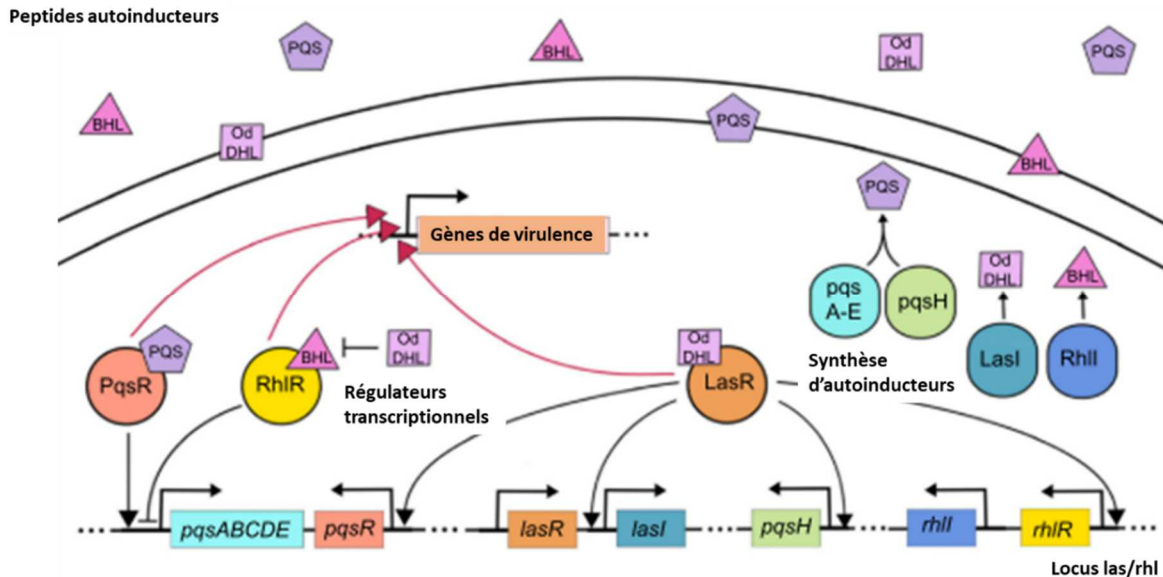
368 la pression sélective est levée; les SCVs sont alors libres de retrouver un phénotype normal.
369 Outre la tobramycine et autres antibiotiques de la classe des aminosides, notons que la
370 ciprofloxacine, le milieu intracellulaire ainsi que le stress oxydatif sélectionnent ou favorisent
371 l'apparition de SCVs (Kahl, Becker and Löffler, 2016). Ainsi, *S. aureus*, grâce à sa capacité
372 d'adaptation à différents stress en partie due à sa faculté à changer entre le phénotype SCV et
373 prototypique, parvient à infecter de manière chronique les patients FK.

374 **1.4 PSEUDOMONAS AERUGINOSA, VIRULENCE ET PATHOGÉNÈSE**

375 *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille aérobic à Gram négatif opportuniste qui peut, dans
376 certaines conditions telle la présence de maladies comme la FK, être pathogène. On le retrouve
377 également dans les infections de brûlures et chez les patients immunosupprimés (Sousa and
378 Pereira, 2014).

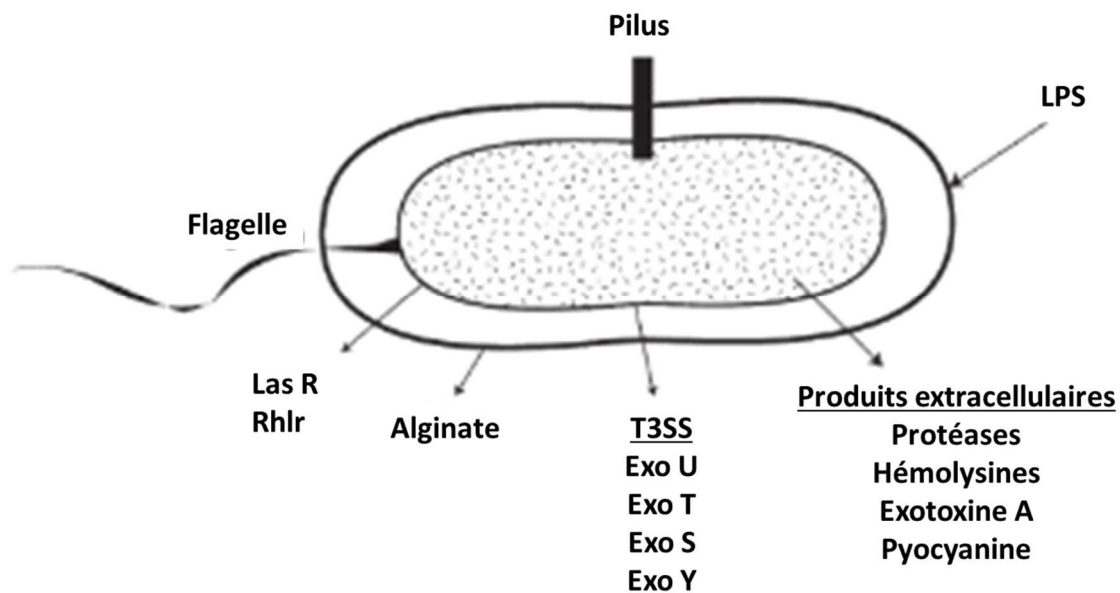
379 Alors que *S. aureus* contrôle sa virulence à l'aide d'un seul système de QS, *P. aeruginosa*
380 contrôle l'expression de ses facteurs de virulence avec 3 systèmes de QS interconnectés : *Las*,
381 *Rhl* et *Pqs* (**Figure 5**). Ces circuits agissent selon la hiérarchie suivante : Le système *Las* active
382 les systèmes *Rhl* et *Pqs*, tandis que *Rhl* inhibe *Pqs* alors que ce dernier active *Rhl*. Alors que les
383 systèmes *Las* et *Rhl* utilisent les *acetyl homoserine lactones* (AHLs) comme AIP, le système
384 *Pqs* emploie les *2-alkyl-4-quinolones* (AQs), *2-heptyl-4-hydroxyquinolones* (HHQ) et les *2-*
385 *heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone* (PQS). Le *N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone*
386 (OdDHL) et le *N-butyryl-L-homoserine lactone* (BHL) sont synthétisés respectivement par LasI
387 et RhlI, et la molécule signal PQS est produite par PqsH et l'opéron PqsA-E. Quand un certain
388 seuil d'AIPs est atteint, ces derniers se lient à leur facteur de transcription respectif : LasR-
389 OdDHL, RhlR-BHL et PqsR-PQS/HHQ. Ces facteurs de transcription activés régulent de
390 nombreux facteurs de virulence ainsi que l'expression des autres systèmes de QS. LasR-OdDHL
391 active *Rhl* et *Pqs* en se liant à leur promoteur. Il active aussi *lasI*, synthétisant davantage de
392 OdDHL ce qui entraîne une boucle d'auto-induction. LasR-OdDHL induit la synthèse de PqsH,
393 à partir du HHQ, en activant *pqsH*. Au contraire, RhlR-BHL réprime l'expression de l'opéron

394 PqsA-E, alors que PqsR-PQS active l'expression de son propre opéron PqsA-E (Reuter,
 395 Steinbach and Helms, 2016).



396
 397 **Figure 5. Système du quorum-sensing chez *P. aeruginosa*.** Adapté de Reuter *et al.* 2016.

398 Ainsi, l'expression de ses facteurs de virulence est sous le contrôle étroit de son QS. Ces derniers
 399 lui permettent de survivre aux molécules de défenses antimicrobiennes synthétisées par l'hôte,
 400 d'échapper à l'évacuation mucociliaire, d'acquérir le fer nécessaire à son métabolisme et
 401 d'éviter les cellules phagocytaires professionnelles ainsi que le complément. Ces différents
 402 éléments sont représentés à la **Figure 6** et discutés au cours des prochains paragraphes.



403

404 **Figure 6. Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.** Adapté de Sadikot *et al.*

405 2005.

406 *P. aeruginosa* exprime des pili lui permettant d'adhérer aux cellules eucaryotes. Son adhérence
 407 est difficilement contrée par le système immunitaire, étant donné que l'épitope antigénique
 408 dominant du pilus n'est pas le domaine de liaison à la cellule; le système immunitaire échoue
 409 alors à empêcher la colonisation du pathogène. Ce dernier est également motile à l'aide de
 410 l'expression d'un flagelle, favorisant également sa colonisation. Une fois cette étape passée, *P.*
 411 *aeruginosa* cesse d'exprimer cette composante hautement immunogène et produit plutôt du
 412 biofilm favorisant sa persistance (Sadikot *et al.*, 2005b).

413 Un déterminant majeur de la virulence de *P. aeruginosa* est sans contredit son système de
 414 sécrétion de type III (T3SS) qui lui permet d'injecter différentes toxines à l'intérieur de la cellule
 415 eucaryote. Ce système est activé seulement à partir du moment où il y a contact et adhésion à la
 416 cellule hôte, résultat en altération de la réponse immunitaire ou en la mort cellulaire. Quatre
 417 effecteurs injectés via le T3SS sont connus et décrits : ExoT, ExoS, ExoU et ExoY.

418 ExoT et ExoS sont deux protéines similaires, avec une homologie d'acides aminés de 75%. Elles
419 possèdent toutes deux, deux domaines fonctionnels : Un activateur Rho de la GTPase en N-
420 terminal et une ADP-ribosyltransférase en C-terminal. L'activité ADP-ribosyltransférase de
421 ExoS est dépendante de la présence d'une protéine eucaryote FAS. Une fois activée, ExoS
422 transfère un groupement ADP-ribosyl à la protéine RAS, induisant une désynchronisation dans
423 la transduction de signaux cellulaire. Conséquemment, ExoS entraînerait une mort nécrotique
424 cellulaire (Sawa, 2014).

425 ExoT, quant à lui, transfère son groupement ADP-ribosyl au régulateur eucaryote de kinase
426 CT10 (Crk). Cette protéine est impliquée dans la phagocytose médiée par les intégrines et dans
427 l'adhésion focale. Lorsqu'elle est ADP-ribosylée, elle n'interagit plus avec les protéines
428 d'adhésion focale, ce qui désynchronise le signal des protéines GTPase Rac pour bloquer
429 l'adhésion et la phagocytose médiée par Rap1 et Rac1. Ainsi, les activités ADP-
430 ribosyltransférase et GTPase sont redondantes dans leur fonction d'inhibition de l'activité de la
431 GTPase Rho (Sawa, 2014).

432 ExoY est une adénylate cyclase; son activité permet de moduler la concentration d'AMPC
433 (adénosine monophosphate cyclique) intracellulaire afin de modifier la morphologie de la
434 cellule infectée. En effet, l'AMPC est un messager ubiquitaire nécessaire à de nombreux
435 processus cellulaires. Ainsi, une cellule saine régulera finement la synthèse et la dégradation
436 d'AMPC dans son cytosol. Bien que l'effet physiologique de ExoY ne soit toujours pas connu,
437 il est répertorié que d'autres adénylate cyclases modulent les fonctions cellulaires ou désactive
438 complètement la cellule. En outre, la cible principale de ces effecteurs sont les cellules
439 effectrices du système immunitaire. Une protéine eucaryote cytosolique est requise pour qu'elle
440 produise son effet : Cette dernière n'a toutefois pas été identifiée. En outre, on croit que le besoin
441 d'un cofacteur eucaryote pour ExoY prévient l'induction non-désirée d'AMPC dans la bactérie
442 avant l'atteinte de la cellule ciblée (Ahuja, Kumar and Bhatnagar, 2004).

443 ExoU est une phospholipase qui a été identifiée et associée aux souches cliniques de *P.*
444 *aeruginosa* particulièrement cytotoxiques, causant des lésions pulmonaires sévères et la

445 septicémie dans des modèles animaux d'infections pulmonaires. En effet, son activité
446 phospholipase lui permet de détruire les membranes cellulaires lipidiques. Comme pour ExoY,
447 son activité requiert une protéine eucaryote; la superoxydase dismutase (SOD1) ubiquitine le
448 domaine carboxyl terminal de ExoU, activant la phospholipase (Sawa *et al.*, 2016).

449 Les molécules du QS, en plus de réguler l'expression de plusieurs facteurs de virulence, peuvent
450 elles-mêmes directement moduler le système immunitaire de l'hôte. Les AHL induisent la
451 production de cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules via l'activation de NF- κ B. COX-2
452 est lié à la production de prostaglandine E2, qui induit la sécrétion de mucus et provoque la
453 vasodilatation et de l'œdème. Il a aussi été montré que les AHLs peuvent induire l'apoptose
454 chez les neutrophiles et les macrophages (Sadikot *et al.*, 2005b).

455 Afin d'acquérir le fer nécessaire à sa croissance, *P. aeruginosa* produit deux sidérophores : la
456 pyocheline et la pyoverdine. Ces derniers sont importants afin de fournir le fer nécessaire au
457 métabolisme (Lamont *et al.*, 2002).

458 Alors que la colonisation bactérienne est promue par les pili et le flagelle, l'invasion des tissus
459 dépend de la production d'élastases, de protéases, d'hémolysines, de cytotoxines et de
460 pyocyanine. Les élastases brisent le collagène, les IgG et IgA ainsi que le complément. Elles
461 rompent aussi l'intégrité de la barrière épithéliale en affectant les jonctions serrées et en
462 interférant avec l'évacuation mucociliaire. Les protéases lysent la fibrine et inactivent les
463 anticorps, le complément, l'IFN- γ et les cytokines. La leucocidine, la phospholipase et la
464 lécithinase favorisent l'invasion par leur effet cytotoxique sur les cellules. La pyocyanine a un
465 effet pro-inflammatoire, antagonise l'évacuation ciliaire et interfère avec les défenses
466 antioxydantes de l'hôte (Sadikot *et al.*, 2005b).

467 L'exotoxine A est une toxine hautement létale. Elle interrompt la synthèse protéique en ADP-
468 ribosylant le facteur-2 d'élongation, ce qui provoque éventuellement la mort cellulaire (Sadikot
469 *et al.*, 2005b).

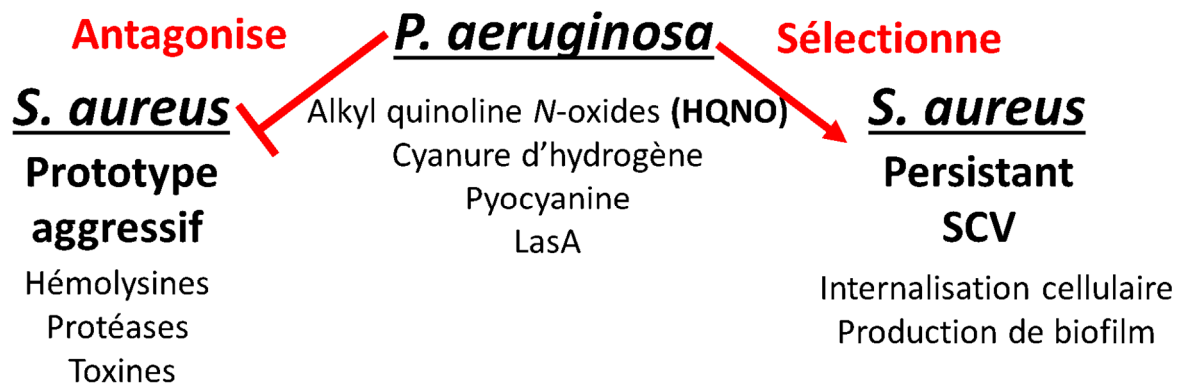
470 Enfin, un autre facteur important pour la virulence de *P. aeruginosa* est l'alginate. Il s'agit d'un
471 polysaccharide étant l'une des composantes principales du biofilm de ce pathogène. Il améliore
472 notamment l'attachement de la bactérie aux surfaces; en effet, les souches ne produisant pas
473 d'alginate s'ancrent moins facilement aux tissus que les souches mucoïdes (produisant du
474 biofilm). De plus, l'alginate confère une résistance accrue face aux agents antimicrobiens, en
475 empêchant ces derniers d'atteindre la bactérie. Il permet également de diminuer l'efficacité du
476 système immunitaire. Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* retrouvées en FK ont souvent une
477 production accrue d'alginate, ce qui contribue à leur persistance. Parmi les facteurs induisant la
478 production d'alginate se trouvent la limitation nutritionnelle, les traitements antibiotiques ainsi
479 qu'une croissance ralentie (Boyd and Chakrabarty, 1995).

480 **1.5 INTERACTIONS POLYMICROBIENNES**

481 *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont fréquemment co-isolés lors d'infections des voies respiratoires
482 chez les patients atteints de la FK. Cette infection mixte engendre également des complications
483 plus graves que si seulement l'un des microorganismes était retrouvé. Ainsi, ces deux
484 pathogènes arrivent à infecter l'un avec l'autre, et au moins à se tolérer *in vivo*; sinon ils ne
485 seraient pas retrouvés ensemble si fréquemment. Or, c'est l'inverse qui se produit dans un
486 environnement *in vitro*; *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont antagonistes. En effet, il a été démontré
487 que *P. aeruginosa* réduit, voire inhibe complètement, la croissance de *S. aureus* dans différents
488 modèles de co-culture *in vitro* (Machan *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 2006; Goerke and Wolz,
489 2010).

490 L'une des molécules sécrétées par *P. aeruginosa* qui affecte particulièrement *S. aureus* est le
491 HQNO (4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide), une molécule de son QS produit par l'opéron
492 *pqsA-E*. Cette molécule, en empoisonnant les cytochromes de la chaîne respiratoire de *S. aureus*,
493 engendre et sélectionne une sous-population de SCVs. Cette molécule vient donc diminuer la
494 croissance du *S. aureus* (Hoffman *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* sécrète aussi de la pyocyanine et
495 le cyanure d'hydrogène qui, comme le HQNO, viennent bloquer la respiration oxydative et
496 sélectionner le phénotype SCV. Un autre facteur de virulence de *P. aeruginosa* ayant un impact

497 négatif sur la survie *in vitro* de *S. aureus* est l'endopeptidase staphylolytique LasA, qui est
 498 responsable de la dégradation de sa paroi cellulaire (Hotterbeekx *et al.*, 2017). L'impact de ces
 499 différentes molécules est résumé dans la **Figure 7**.



500

501 **Figure 7. L'interaction *in vitro* entre *P. aeruginosa* et *S. aureus***

502 Ainsi, *P. aeruginosa* est typiquement antagoniste envers *S. aureus*. Toutefois, nous avons
 503 récemment démontré au laboratoire que des souches cliniques co-isolées ne démontreraient plus
 504 certaines caractéristiques antagonistes typiques. Notamment, le surnageant de *P. aeruginosa*
 505 n'induisait plus la formation de biofilm chez *S. aureus* comme il le fait normalement; or, *P.*
 506 *aeruginosa*, en induisant le phénotype SCV, provoque normalement aussi la surproduction de
 507 biofilm (Fugère *et al.*, 2014). Il semble donc y avoir une certaine adaptation entre *S. aureus* et
 508 *P. aeruginosa* qui surviendrait lors d'infections mixtes persistantes, permettant une réduction
 509 de l'antagonisme inter-espèces. De manière similaire, une autre étude a aussi démontré que des
 510 isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients FK co-infectés avec *S. aureus* étaient moins
 511 antagonistes envers ces derniers que les isolats provenant de mono-infections (Limoli *et al.*,
 512 2017). Plus précisément, les co-isolats produisant le plus d'alginate étaient ceux réduisant le
 513 moins la population de *S. aureus in vitro*. Ainsi, à l'aide de mutants exprimant constitutivement
 514 de l'alginate grâce à l'inactivation du répresseur *muca*, ils sont arrivés à prouver que
 515 l'expression d'alginate arrêtaient l'antagonisme de *P. aeruginosa* envers *S. aureus in vitro*. Le
 516 principe moléculaire de ce changement de comportement viendrait du fait que l'expression

517 d'alginate réduit l'expression d'autres facteurs de virulence, notamment la pyoverdine et le
518 HQNO, ceux-ci étant responsables de l'antagonisme.

519 Cependant, bien qu'il ait déjà été démontré que *P. aeruginosa* n'antagonise pas toujours *S.*
520 *aureus* ou que ce dernier ne réagit pas forcément de manière prototypique *in vitro*, très peu
521 d'informations sont disponibles concernant l'interaction entre des co-isolats de *P. aeruginosa*
522 et de *S. aureus in vivo*. Or, il serait utile de vérifier l'interaction de ces co-isolats dans des
523 modèles animaux d'infection, puisque ces pathogènes pourraient réagir différemment que dans
524 les modèles *in vitro*. De plus, il semble important de vérifier le comportement d'isolats cliniques
525 provenant d'infections mixtes, et non pas seulement des souches prototypiques, car il a été
526 démontré que ces deux types de souches n'ont pas le même comportement lors de culture mixte.
527 L'utilisation de co-isolats cliniques représenteraient donc un modèle plus représentatif de la
528 réalité.

529 **1.6 CONTEXTE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

530 *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont deux pathogènes prévalents et dangereux pour les patients
531 atteints de la FK. De graves problèmes de santé découlent des infections pulmonaires chroniques
532 mixtes à *S. aureus* et *P. aeruginosa* chez ces patients; il s'agit donc d'un problème important à
533 régler. Les connaissances actuelles concernant l'interaction entre ces deux microorganismes
534 s'appuient essentiellement sur des études *in vitro*, qui ne reflètent pas nécessairement la vraie
535 nature de leur interaction *in vivo*, où le système immunitaire, une limitation nutritionnelle
536 différente et la présence de cellules hôte seront des paramètres supplémentaires à tenir en
537 compte. À notre connaissance, l'impact de souches cliniques de *P. aeruginosa*, co-isolées avec
538 *S. aureus*, sur la survie de *S. aureus* n'avait jamais été étudié dans un modèle *in vivo* d'infection
539 pulmonaire. Notre but était donc de compléter les observations *in vitro* afin de mieux
540 comprendre comment ces deux pathogènes parviennent à coexister dans un hôte, malgré les
541 interactions antagonistes connues de *P. aeruginosa* sur *S. aureus*.

542 Nous avons alors établi l'hypothèse suivante : La coexistence prolongée de souches de *S. aureus*
543 et de *P. aeruginosa* mène à des changements physiologiques et/ou génétiques, pouvant moduler
544 leur virulence et coexistence *in vivo*.

545 Nos objectifs étaient de :

- 546 1) montrer que les souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* ayant co-colonisés des patients
547 FK présentent une virulence et une interaction inter-espèces *in vitro* différentes des
548 souches prototypiques.
- 549 2) montrer que les souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* ayant co-colonisés des patients
550 FK présentent une virulence et une interaction inter-espèces *in vivo* favorisant la co-
551 colonisation.
- 552 3) établir quelles sont les différences physiologiques et/ou génétiques observées à la suite
553 de la coexistence de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* et les caractériser.

554

555

CHAPITRE 2

556

ARTICLE SCIENTIFIQUE

557 2.1 INTRODUCTION DE LA PUBLICATION

558 Titre: Despite antagonistic activities *in vitro*, *Pseudomonas aeruginosa* enhances
559 *Staphylococcus aureus* colonization in a murine lung infection model.

560 Guillaume Millette^a, Jean-Philippe Langlois^a, Éric Brouillette^a, Eric H. Frost^b, André M.
561 Cantin^b, François Malouin^{a#}

562 L'article sera soumis à *Infection and immunity*.

563 Originalité :

564 Cet article montre pour la première fois que *P. aeruginosa* favorise la colonisation de *S. aureus*
565 lors d'infections pulmonaires. Il n'y a donc pas d'antagonisme entre les deux microorganismes
566 comme répertorié *in vitro* mais plutôt un phénomène de coopération.

567 Contribution :

568 Guillaume Millette : Étudiant gradué sous la direction du Pr. F. Malouin. J'ai effectué les essais
569 de cinétique de croissance *in vitro*, l'essai de co-culture sur gélose, les infections mixtes dans le
570 modèle pulmonaire chez la souris, extrait et quantifié la MPO et vérifié la surexpression des
571 gènes ICAM-1 et ITGA-5. J'ai également rédigé l'article.

572 Jean-Philippe Langlois : Étudiant gradué sous la direction du Pr. F. Malouin. Il a contribué à
573 l'obtention des résultats des essais de cinétique de croissance *in vitro*.

574 Éric Brouillette : Professionnel de recherche sous la direction du Pr. F. Malouin. Il a établi le
575 modèle d'infection pulmonaire chez la souris et est responsable de la formation du personnel
576 pour l'utilisation de modèles animaux.

577 Eric H. Frost : Professeur au CHUS. Il a supervisé l'isolement des souches en laboratoire
578 clinique.

579 André M. Cantin : Professeur et docteur au CHUS. Il est le chercheur responsable pour
580 l'obtention des isolats cliniques et du suivi clinique des patients associés.

581 François Malouin : Le Pr Malouin a été le directeur de recherche des étudiants gradués indiqués
582 plus haut. Il a contribué au plan de travail, l'écriture du manuscrit et est l'auteur de
583 correspondance.

584 **2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE**

585 **Title: Despite antagonistic activities *in vitro*, *Pseudomonas aeruginosa* enhances**
586 ***Staphylococcus aureus* colonization in a murine lung infection model**

587 **Running title: *P. aeruginosa* enhances *S. aureus* colonization *in vivo***

588 **Guillaume Millette^a, Jean-Philippe Langlois^a, Eric Brouillette^a, Eric H. Frost^b, André M.**
589 **Cantin^b, François Malouin^{a#}**

590 **a** Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de
591 biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada,

592 **b** Service de pneumologie, Département de médecine, Faculté de médecine et des sciences de
593 la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

594 **Corresponding author: #François Malouin, E-mail: Francois.Malouin@USherbrooke.ca.**

595 **2.2.1 ABSTRACT**

596 The most prevalent pathogens in cystic fibrosis (CF) are *Staphylococcus aureus* and
597 *Pseudomonas aeruginosa*. Their co-infection worsens the clinical outcome. However,
598 prototypical strains are antagonistic *in vitro*. We sought to resolve the apparent discrepancy
599 between the *in vitro* observations and the high occurrence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-
600 infections in CF. First, growth kinetics were followed *in vitro* for co-cultures of clinical co-
601 isolates from adult CF patients and showed that not all *P. aeruginosa* strains affected *S. aureus*
602 viability (CFU). Also, co-cultures on agar plates allowed visualization of *S. aureus* small-colony
603 variants (SCVs) around some strains of *P. aeruginosa* but not others whether or not *S. aureus*
604 viability was reduced in growth kinetics experiments. The outcome of those complex *S. aureus*-
605 *P. aeruginosa* interactions was then characterized *in vivo* using a mouse lung infection model.
606 After mono- or co-infections, lung homogenates were plated on selective media allowing CFU

607 counts of either bacterium. The extent of inflammation was assessed via myeloperoxidase
608 quantification. Overall, 35 *P. aeruginosa* and 10 *S. aureus* strains (including clinical, reference
609 and mutant strains), for a total of 200 co-infections, were evaluated. We observed that *S. aureus*
610 colonization of the lung tissue was promoted by *P. aeruginosa* and even by strains showing
611 antagonism *in vitro*. The promotion was proportional to the extent of *P. aeruginosa* colonization
612 but no correlation was found with the degree of inflammation and no specific virulence-
613 associated factors (either for *P. aeruginosa* or *S. aureus*) was identified as being linked to this
614 phenomenon using known mutant strains. By following expression of two possible cell receptors
615 for *S. aureus*, *i.e.*, ICAM-1 and ITGA-5 (a marker for integrin $\alpha_5\beta_1$) in the lung tissue by RT-
616 qPCR, results showed that the presence of *P. aeruginosa* significantly increased their expression
617 while a mono-infection by *S. aureus* did not. The observed increased of *S. aureus* lung
618 colonization in presence of *P. aeruginosa* supports the high occurrence of co-infections by these
619 pathogens and their combined deleterious effect in CF. The mechanism by which *P. aeruginosa*
620 improves *S. aureus* colonization might involve an increase of cell surface receptors for the latter.

621 2.2.2 INTRODUCTION

622 Cystic fibrosis (CF) is the most common recessive genetic disorder leading to chronic
623 pulmonary infections, gastrointestinal disorders, diabetes and other health complications. The
624 most severe complications are associated with recurrent lung infections, which are responsible
625 for high morbidity and mortality (Cystic Fibrosis Canada, 2018). A gene defect in the CF
626 transmembrane conductance regulator (CFTR), which is a membrane protein and chloride
627 channel, causes abnormally thick and viscous mucus production in the lung mucosa (Ratjen,
628 2009; Kreda, Davis and Rose, 2012). This defect affects muco-ciliary clearance, blocks vacuolar
629 macrophages and thus supports bacterial growth (Marshall and Carroll, 1991; Carnoy *et al.*,
630 1993, 1994). Infections lead to inflammation, and the host response stimulates further mucus
631 production (Gómez and Prince, 2007; Ratjen, 2009). The mucus, rich in nutrients and not being
632 efficiently cleared, promotes colonization of opportunistic pathogens (Palmer *et al.*, 2005;
633 Sriramulu *et al.*, 2005). The establishment of this feedback loop results in frequent exacerbations

634 and increasingly reduced lung functions, which eventually lead to death (Lyczak, Cannon and
635 Pier, 2002).

636 Throughout their lives, CF patients will be infected by many opportunistic environmental
637 bacteria, the two most common being *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.
638 The following chronological trend occurs in most patients: *S. aureus* typically colonizes younger
639 patients, then its prevalence declines in the adulthood. On the contrary, *P. aeruginosa* infections
640 are infrequent in childhood but become predominant later in adult CF patient lives. Despite their
641 seemingly sequential appearances, both pathogens remain highly prevalent through all stages of
642 CF patient lives, with respectively, 59.9% and 40.2% of patients infected by *S. aureus* and *P.*
643 *aeruginosa* (Cystic Fibrosis Canada, 2018). While *P. aeruginosa* infections undoubtedly
644 deteriorate patient health (Sadikot *et al.*, 2005a; Harun *et al.*, 2016), the contribution of *S. aureus*
645 infections to morbidity and mortality remains controversial with not all studies agreeing whether
646 it can single-handedly worsen prognosis (Junge *et al.*, 2016; Limoli *et al.*, 2016). However,
647 microbial interactions are possible. Cigana *et al.* (2018) investigated *S. aureus-P. aeruginosa*
648 interactions in a murine chronic lungs infection model. Following the natural course of
649 infections in CF, mice were first infected with *S. aureus*, causing abscess-like wounds, then
650 were further infected by *P. aeruginosa*. Pre-infection of mice with *S. aureus* conferred *P.*
651 *aeruginosa* the ability to chronically infect the animals, reminiscent of that observed in CF-
652 afflicted humans. Furthermore, many reports have associated *S. aureus-P. aeruginosa* co-
653 infections with a worse clinical outcome for CF patients such as decreased pulmonary functions,
654 more frequent exacerbations and increased mortality (Hubert *et al.*, 2013; Limoli *et al.*, 2016).
655 Given these insights, it appears critical to further investigate the interactions between both
656 microorganisms, to help prevent and treat deleterious co-infections.

657 *S. aureus* small-colony variants (SCVs) are respiratory-deficient variants differing from their
658 prototypical counterparts by their slow growth, alternative expression of virulence genes and
659 persistence in chronic infections (Moisan *et al.*, 2006a; Mitchell *et al.*, 2013b). SCVs are
660 frequently associated with chronic infections, including CF lung infections (Kahl, Becker and
661 Löffler, 2016). Their ability to persist is mainly due to increased biofilm production and

662 internalization into host cells, allowing them to evade the action of antibiotics and the immune
663 system (Proctor *et al.*, 2006). The alternative sigma factor B (SigB) is an important regulator of
664 virulence in SCVs, and dominate over the quorum-sensing (QS) Agr system, which is
665 responsible for exotoxins and hydrolytic enzymes expression (Novick and Geisinger, 2008;
666 Mitchell *et al.*, 2013a). The presence of SCVs was directly associated with a worse respiratory
667 outcome in children with CF (Wolter *et al.*, 2013). Interestingly, *P. aeruginosa* can induce the
668 SCV phenotype in *S. aureus*. *P. aeruginosa* produces a wide variety of QS molecules to
669 coordinate the expression of its virulence factors, motility and extracellular matrix formation
670 (Williams and Cámara, 2009). Among *P. aeruginosa* QS-controlled virulence factors, many
671 such as the elastases, pyocyanin, pyoverdine, hydrogen cyanide and alkyl quinolones were
672 shown to negatively affect *S. aureus* growth *in vitro* (Machan *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 2006;
673 Goerke and Wolz, 2010). More specifically, *P. aeruginosa* 2-heptyl-4-hydroxy quinoline N-
674 oxide (HQNO) induces the SCV phenotype by acting as a respiratory chain inhibitor for *S.*
675 *aureus* (Lightbown and Jackson, 1956). HQNO-sensitized *S. aureus* are known to produce more
676 biofilm, and there is a direct correlation between HQNO levels and biofilm production by *S.*
677 *aureus* (Mitchell *et al.*, 2010). Interactions between *P. aeruginosa* and *S. aureus* during a co-
678 infection in CF patients are likely to occur and these may modulate virulence in unexpected
679 ways.

680 On the other hand, we previously demonstrated that *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains co-
681 isolated from a same CF patient do not always interact as expected for prototypic strains (Fugère
682 *et al.*, 2014). For instance, a high HQNO production by some *P. aeruginosa* strains does not
683 proportionally induce biofilm production by the co-isolated *S. aureus* strain. This suggests that
684 co-isolates may adapt to each other in order to persist in the lung. Similarly, Limoli *et al.* 2017
685 recently demonstrated that *P. aeruginosa* isolates from long-term coinfecting patients did not
686 antagonize *S. aureus* *in vitro*. While such studies show that *P. aeruginosa* does not always
687 antagonize *S. aureus* *in vitro*, data from co-infection animal models are needed to better
688 understand clinical observations associated with *P. aeruginosa* and *S. aureus* co-infections.

689 To our knowledge, the impact of *P. aeruginosa* CF clinical strains on *S. aureus* colonization *in*
690 *vivo* has never been systematically studied. The objective of the present study was to evaluate
691 the circumstances allowing *S. aureus* to colonize the lung in presence of *P. aeruginosa*. We first
692 used *in vitro* models to characterize clinical strains and the types of interactions between *P.*
693 *aeruginosa* and *S. aureus* and then compared their ability to co-colonize in a murine lung
694 infection model. Our findings show that *S. aureus* clearly profit from the presence of *P.*
695 *aeruginosa in vivo*, whether or not antagonism is seen *in vitro*.

696 2.2.3 MATERIALS AND METHODS

697 ETHICS STATEMENT

698 The animal experiments were carried out according to the guidelines of the Canadian Council
699 on Animal Care and the institutional ethics committee on animal experimentation of the *Faculté*
700 *des Sciences of Université de Sherbrooke*, which specifically approved the protocols used for
701 this study (FM2014-02 and FM2018-01B).

702 BACTERIAL STRAINS AND GROWTH CONDITIONS

703 *P. aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995) and *S. aureus* CF07-L (Moisan *et al.*, 2006b) were
704 used as prototypical control strains. An additional 29 *P. aeruginosa* and 5 *S. aureus* clinical
705 isolates were also used in this study. These isolates were previously characterized and obtained
706 from 32 adult CF patients (Fugère *et al.*, 2014). These included 16 *P. aeruginosa* that were co-
707 isolated with *S. aureus* and 13 that were not. Among these clinical strains, *S. aureus* strains
708 CF6B-L, CF22A-L, CF39A-L, CF54A-L and CF112A-L were more specifically selected and
709 studied because their biofilm production was not stimulated by their co-isolated *P. aeruginosa*
710 PAC6B, PAC22A, PAC39A, PAC54A and PAC112A, respectively (Fugère *et al.*, 2014).

711 To determine the impact of different bacterial components on the *in vivo* colonization of *S.*
712 *aureus* in the presence of *P. aeruginosa*, different mutant strains from both species were also

713 used in this study. **Table 1** shows the relevant characteristics of those mutants and their origin.
 714 The *S. aureus* NRS strains were obtained from NARSA (Network on Antimicrobial Resistance
 715 in *S. aureus*). TSA and TSB (BD, Mississauga, ON, Canada) were generally used as growth
 716 media. Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB; BD, Mississauga, ON, Canada) was
 717 used in growth kinetics experiments.

718 **Table 1. *P. aeruginosa* and *S. aureus* reference and mutant strains**

Strain	Description	Relevant property	Reference
<i>P. aeruginosa</i>			
PA14	Clinical isolate UCBPP-PA14, Rif ^R	Prototypic reference strain	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 Δ lasR/rhlR	PA14 lasR/rhlR; Gen ^R , Tet ^R	Altered in quorum-sensing circuitry and all AQS ¹ production	(Dekimpe and Déziel, 2009)
PA14 Δ pqsA	PA14 pqsA::TnphoA; Km ^R	Altered in HHQ ² , PQS ³ and HQNO ⁴ production	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
PA14 Δ lasA	PA14 lasA::TnMrT7; Gen ^R	Deficient for the endopeptidase LasA	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. aureus</i>			

CF07-L	Clinical isolate	Prototypic reference strain	(Mitchell <i>et al.</i> , 2010)
NRS149	Standard <i>agr</i> group II prototype	Prototypic reference strain	(Ji, Beavis and Novick, 1997; Lyon <i>et al.</i> , 2000)
NRS155	<i>agr</i> -null derivative of NRS149	Deficient for the Agr regulator	(Lyon <i>et al.</i> , 2000)
Newbould	Reference isolate ATCC 29740	Prototypic reference strain	(Moisan <i>et al.</i> , 2006a)
Newbould Δ <i>sigB</i>	Newbould <i>sigB::emrA</i> ; Erm ^R	Deficient for the alternative transcription factor SigB	(Moisan <i>et al.</i> , 2006a)
8325-4	Naturally deficient for <i>rsbU</i>	Reduced SigB activity	(Mitchell <i>et al.</i> , 2012)
SH1000	Isogenic to 8325-4, but with a functional <i>rsbU</i> allele	Functional SigB activity	(Mitchell <i>et al.</i> , 2012)

8325-4 $\Delta\Delta$ <i>fnbAB</i>	8325-4 with Tet ^R and Erm ^R cassettes inserted in <i>fnbA</i> and <i>fnbB</i> ; Tet ^R , Erm ^R	Reduced SigB activity; FnbA and FnbB absent	(Mitchell <i>et al.</i> , 2008)
------------------------------------	--	---	---------------------------------------

719 ¹AQs : 2-alkyl-4-(1H)-quinolones

720 ² HHQ : 2- heptyl-4-hydroxyquinoline

721 ³ PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

722 ⁴ HQNO : 2- heptyl-4-hydroxy quinoline N-oxide

723

724 GROWTH KINETICS EXPERIMENTS

725 The effect of *P. aeruginosa* isolates on *S. aureus* was investigated in growth kinetics
726 experiments, similarly to that we previously described (Boulangier *et al.*, 2015). Both *S. aureus*
727 and *P. aeruginosa* were grown alone or in the presence of each other. Individual strains (10⁵ to
728 10⁶ CFU/ml) were used to inoculate CAMHB cultures. The cultures were incubated for 48h
729 with shaking (225 rpm) at 35°C. Samples were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 hours after
730 the initial inoculation, serially diluted and plated on TSA with 1 µg/ml of rifampicin (CLSI,
731 2018) and on TSA with 10 µg/ml of polymyxin B (CLSI, 2018) for selection of *P. aeruginosa*
732 and *S. aureus* CFU, respectively. Bacterial counts were determined after a 24-h incubation at
733 35°C and confirmed after 48h. Data were collected from at least three independent assays.

734 CO-CULTURE PETRI MODEL

735 To visualize colony morphology of *S. aureus* grown in presence of *P. aeruginosa*, a co-culture
736 Petri model was established. Approximately 10⁵ CFU/ml of *S. aureus* was suspended in
737 phosphate-buffered saline (PBS) and then spread on TSA plates. *P. aeruginosa* was suspended
738 in PBS at a concentration of 10⁷-10⁸ CFU/ml, then 10 µl of the suspension was spotted at the
739 center of the *S. aureus* inoculated plates. Plates were incubated 24h at 35°C, then areas of

740 interest were photographed using a Leica M165 FC stereomicroscope (Leica, Concord, Ontario,
741 Canada) with an objective of 0.63X. *S. aureus* showing a reduced colony size and a loss of
742 pigmentation were considered SCVs. Observations were collected from three independent
743 experiments.

744 MOUSE LUNG MONO- AND CO-INFECTION MODEL

745 The mouse model of pulmonary infection was described before (Mitchell *et al.*, 2013b) and was
746 used here to investigate the extent of colonization by *S. aureus* and *P. aeruginosa in vivo* during
747 mono and coinfections. Briefly, overnight bacterial cultures were used to inoculate fresh TSB
748 at an $A_{600\text{nm}}$ of 0.1. Cultures were grown at 35°C with shaking (225 rpm) until the $A_{600\text{nm}}$ reached
749 0.6 to 0.8. Bacterial cells were then collected by centrifugation, washed and suspended in PBS.
750 Strains were suspended in 50 μl to concentrations required for infection: 2×10^6 CFU for *S.*
751 *aureus* and *P. aeruginosa* PA14, 2×10^7 CFU for all the other clinical strains of *P. aeruginosa*.
752 For mixed infections, the quantity of total bacteria was equivalent to the sum of each inoculum
753 used in mono infection. A sterilized 250- μl glass syringe (Hamilton Company, Reno, Nevada,
754 USA) equipped with a bent feeding needle (Fine Science Tools, North Vancouver, Canada) was
755 used to infect CD-1 female mice (22–24 g, Charles River, Sherbrooke, Québec, Canada). Using
756 an otoscope equipped with a speculum (model 21700, Welch Allyn, Mississauga, Ontario,
757 Canada), the trachea was located, and the tip of the feeding needle was inserted. While
758 maintaining the otoscope in place, 50 μl of the inoculum was instilled. After 24h of infection,
759 the animals were sacrificed and the lungs were harvested and homogenized using a Kinematica
760 Polytron homogenizer 10-35 GT (Kinematica, Bohemia, New York, USA) in 1.5 ml of PBS.
761 CFU were enumerated by serially diluting homogenates in PBS and plating on TSA with 1
762 $\mu\text{g/ml}$ of rifampicin and on TSA with 10 $\mu\text{g/ml}$ of polymyxin B, allowing selective growth of
763 *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively. Part of the homogenates was kept at -80°C until used
764 for measurement of myeloperoxidase (MPO) activity (see below).

765 MPO ACTIVITY

766 Assessment of inflammation and infiltration of neutrophils during mono or coinfections of
767 mouse lung tissues was evaluated by quantification of MPO activity using the o-dianisidine-
768 H₂O₂ method, as previously described (Côté-Gravel *et al.*, 2016). Briefly, 10 µl of lungs
769 homogenate were mixed with a solution of o-dianisidine hydrochloride (167 µg/ml) (Sigma-
770 Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 0.0005% H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario,
771 Canada), 50 mM hexade-cyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 50 mM phosphate
772 buffer at a pH of 6.0, in a 96-well plate. The A_{460nm} was then measured at intervals of 15s for 8
773 min and the maximum reaction rate was considered. One unit of MPO was defined as the
774 quantity of enzyme degrading 1 µmol of H₂O₂/min at 25°C, with an absorption coefficient of
775 11.3 mM⁻¹ cm⁻¹ at 460 nm for o-dianisidine. MPO units were normalized according to the lungs
776 weight.

777 RNA ISOLATION AND RT-QPCR

778 Non infected and infected (mono and coinfections) mouse lungs were homogenized on ice in 1
779 ml Trizol (Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York, USA) using a Dounce tissue grinder,
780 according to the manufacturer indications. RNA was extracted from homogenates using the
781 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada), following the manufacturer protocol.
782 RNA integrity was verified by migration on 1% agarose gel and absence of residual DNA was
783 confirmed by PCR with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers and
784 subsequent migration on 1.5% agarose gel. cDNA was obtained by reverse transcription from
785 RNA using the 5X All-In-One RT MasterMix kit (Applied Biological Materials, Richmond,
786 British-Columbia, Canada). Two µl of cDNA was amplified with the SYBR Green JumpStart
787 Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) by qPCR. GAPDH was used as an internal gene control for all
788 sample, to relativize intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and integrin alpha-5 (ITGA-
789 5) expression. The following primers DNA sequences were used :

790 ICAM-1 FWD 5'-GTTCCAGTATGACTCCACTCACGG-3'; ICAM-1 REV 5'-
791 CGGCCTCACCCCATTTGATGTTAG-3'; ITGA-5 FWD 5'-
792 TGTTTCAGGCTGCGCTGTGA - 3'; ITGA-5 REV 5' - CTGGCGGCTCAGTATCTCCTC -
793 3'; GAPDH FWD 5'-GTTCCAGTATGACTCCACTCACGG-3'; GAPDH REV 5'-
794 CGGCCTCACCCCATTTGATGTTAG - 3'.

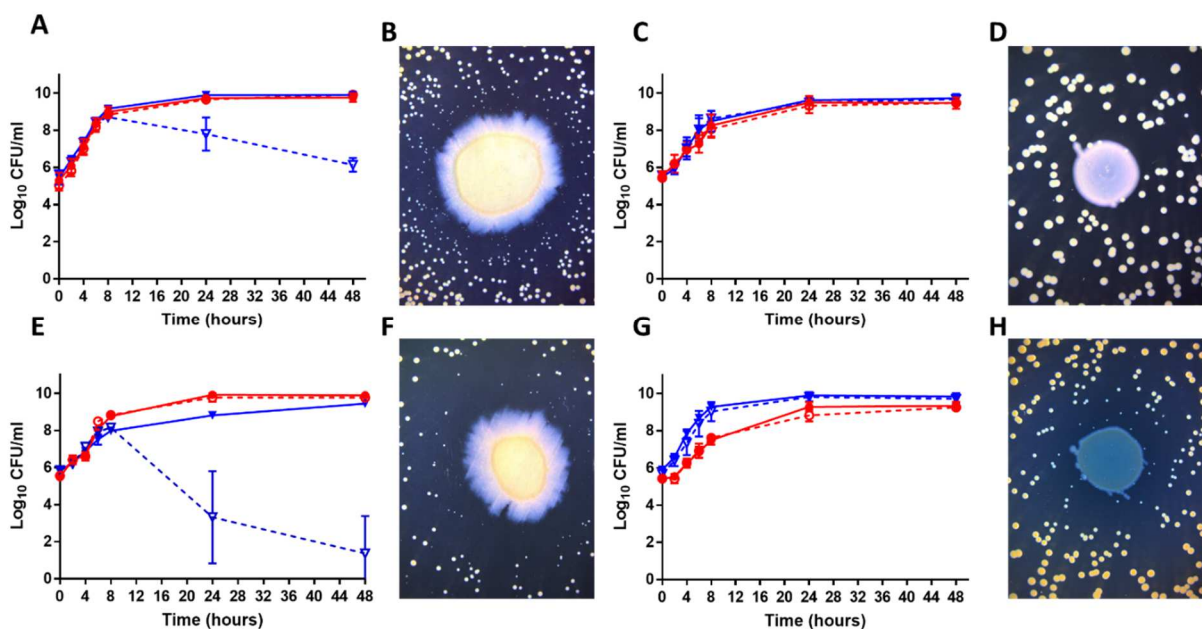
795

796 2.2.4 RESULTS

797 CLINICAL CO-ISOLATES SHOW DIFFERENT LEVELS OF ANTAGONISM *IN VITRO*

798 Using a collection of bacterial isolates from CF patients, Fugère *et al.* (2014) showed that co-
799 isolated strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus* display atypical interactions *in vitro*. Notably,
800 when compared to prototypical strains, much less stimulation of *S. aureus* biofilm production
801 in presence of *P. aeruginosa* culture supernatants was seen when co-isolates from CF patients
802 were studied (Fugère *et al.*, 2014). Interactions of co-isolates were thus further examined in the
803 present work. Growth kinetics and viability of both species in co-cultures *in vitro* were
804 measured. The prototypical strains PA14 and CF07-L, both extensively characterized in the
805 scientific literature (Rahme *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2010), were considered as a suitable
806 control pair for typical antagonistic interactions between these organisms. **Figure 1** reports the
807 types of interactions we observed. First, **Figure 1A** confirms the strong antagonism of PA14
808 over *S. aureus* CF07-L. Viability of *S. aureus* CF07-L was lowered by *P. aeruginosa* PA14
809 after 8h of co-culture with viable counts dropping by 2.1 and 3.8 log₁₀ CFU/mL at 24h and 48h,
810 respectively, compared to the counts of *S. aureus* in the mono-culture. Furthermore, the co-
811 culture on agar plates, revealed formation of small colonies of *S. aureus* CF07-L around the
812 large central colony of *P. aeruginosa* PA14 (**Figure 1B**), which is also typical of *P. aeruginosa*
813 antagonism on *S. aureus* through the production of HQNO (Hoffman *et al.*, 2006). We observed
814 a similar antagonism by *P. aeruginosa* on *S. aureus* for the CF patients co-isolates PAC6B and
815 CF6B-L, PAC39A and CF39A-L, and PAC112A and CF112A-L, respectively (**Figure S1**),
816 although the reduction of *S. aureus* CFU/mL counts at 48h was less to that observed for CF07-
817 L co-cultured with PA14 (*i.e.*, 1.9, 2.1, and 3.6 log₁₀, respectively). On the other hand, CF patient
818 *P. aeruginosa* PAC54A did not affect viability of its co-isolate *S. aureus* CF54A-L (**Figure 1C**)
819 and no small colony of *S. aureus* and no growth inhibition was seen around *P. aeruginosa* on
820 the agar plate (**Figure 1D**). When substituting *P. aeruginosa* PAC54A by PA14, a very strong
821 antagonism of *S. aureus* CF54A-L was observed (**Figure 1E, 1F**) showing that the lack of
822 antagonism in **Figure 1C** and **1D** was linked to *P. aeruginosa* PAC54A and not an insensitivity
823 of *S. aureus* CF54A-L to *P. aeruginosa*. Interestingly, yet another scenario was observed with

824 the CF patient co-isolates *P. aeruginosa* PAC22A and *S. aureus* CF22A-L, which demonstrated
 825 no effect on *S. aureus* viability (**Figure 1G**) although small colonies of *S. aureus* appeared
 826 around the *P. aeruginosa* central colony on agar plate (**Figure 1H**). In short, while *P. aeruginosa*
 827 PA14 displayed a strong antagonism on *S. aureus* CF07-L (or CF54A-L), the CF patient co-
 828 isolated *P. aeruginosa*-*S. aureus* pairs that we tested showed less or no antagonism in the co-
 829 culture *in vitro* models (broth and agar).



830
 831 **Figure 1. Growth kinetics and bacterial viability of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in mono**
 832 **or co-cultures.**

833 In A, C, E and G, bacteria were grown in broth cultures and viability is expressed in log_{10}
 834 CFU/ml. The CFU were determined by plating sample dilutions on TSA supplemented with
 835 polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). The solid dots (●) and full red lines
 836 represent counts in *P. aeruginosa* mono-cultures; the open dots (○) and dashed red lines, *P.*
 837 *aeruginosa* counts in co-cultures; the solid triangles (▼) and full blue lines, counts of *S. aureus*
 838 in mono-cultures; the open triangles (▽) and dashed blue lines, *S. aureus* counts in co-cultures.
 839 In B, D, F and H, the Petri assay was realized by plating *S. aureus* on TSA and applying a spot
 840 of *P. aeruginosa* in the centre of the plate. The plates were photographed after 24h of incubation.
 841 The *P. aeruginosa* and *S. aureus* pairs tested were PA14 and CF07-L (in A and B), PAC54A

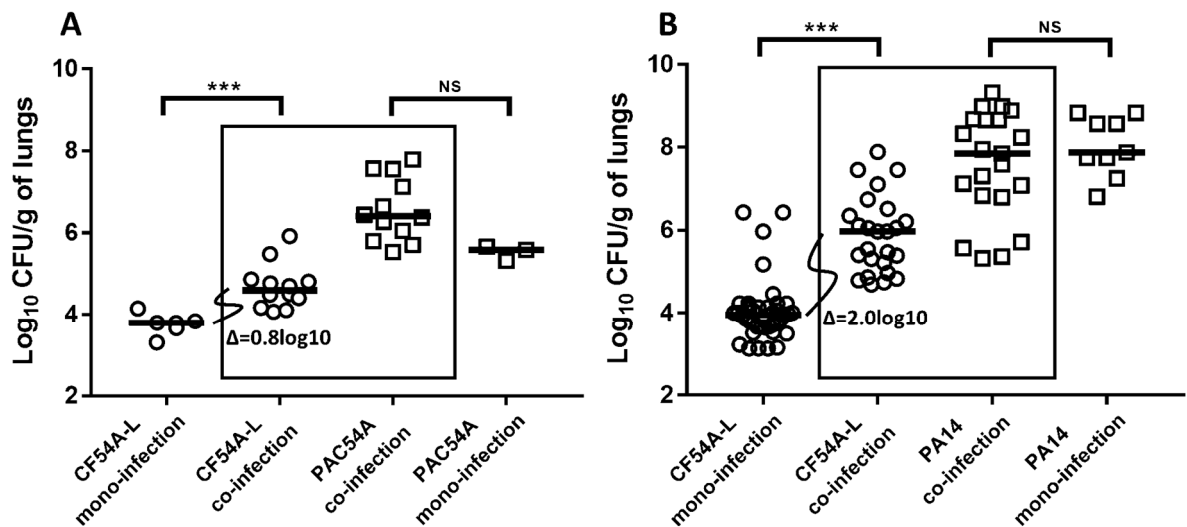
842 and CF54A-L (in C and D), PA14 and CF54A-L (in E and F), and PAC22A and CF22A-L (in
843 G and H), respectively.

844 *P. AERUGINOSA* INCREASES *S. AUREUS* COLONIZATION IN A MOUSE LUNG INFECTION MODEL,
845 REGARDLESS OF THEIR TYPE OF INTERACTIONS *IN VITRO*

846 Considering the atypical and sometime non-antagonistic interactions recorded *in vitro* for some
847 *S. aureus* – *P. aeruginosa* clinical co-isolates, the outcome of co-infections was studied *in vivo*
848 using a mouse pulmonary infection model. In the murine infection model, bacterial colonization
849 of the lungs in mono-infections were compared to co-infections by measuring species-specific
850 CFU counts after 24h. *P. aeruginosa* PAC54A, a clinical strain showing no antagonism *in vitro*
851 toward its co-isolate *S. aureus* CF54A-L (**Fig 1C, 1D**), promoted *S. aureus* lung colonization
852 by a median increase of 0.8 log₁₀ (**Figure 2A**) in comparison to colonization of CF54A-L in a
853 mono-infection. PA14 and CF07-L, displaying antagonism in the *in vitro* models described
854 earlier (**Figure 1A, 1B**), were considered again as the control pair. Surprisingly, the antagonism
855 observed *in vitro* did not translate *in vivo* and on the contrary, cooperation was observed as *P.*
856 *aeruginosa* PA14 increased *S. aureus* CF07-L CFU counts compared to the mono-infection (a
857 median increase of 1.7 log₁₀, **Figure S2**). Due to this unexpected *in vivo* cooperation from a
858 bacterial pair showing antagonism *in vitro*, PA14 co-infection was tested again, but this time
859 with *S. aureus* CF54A-L, which was even more strongly affected by *P. aeruginosa* PA14 *in*
860 *vitro* (**Figure 1E, 1F**). Once again, *S. aureus* CF54A-L colonization was enhanced by the
861 presence of *P. aeruginosa* PA14 despite the strong antagonism *in vitro* (2.0 log₁₀ median
862 increase compared to the mono-infection, **Figure 2B**). Noteworthy, in all cases, *P. aeruginosa*
863 colonization was never promoted by the presence of *S. aureus* (comparison of *P. aeruginosa*
864 mono and co-infections, not statistically significant, **Figure 2A, 2B** and **S2**). In summary, *P.*
865 *aeruginosa* promotes *S. aureus* lung colonization, even if it is antagonistic *in vitro*.

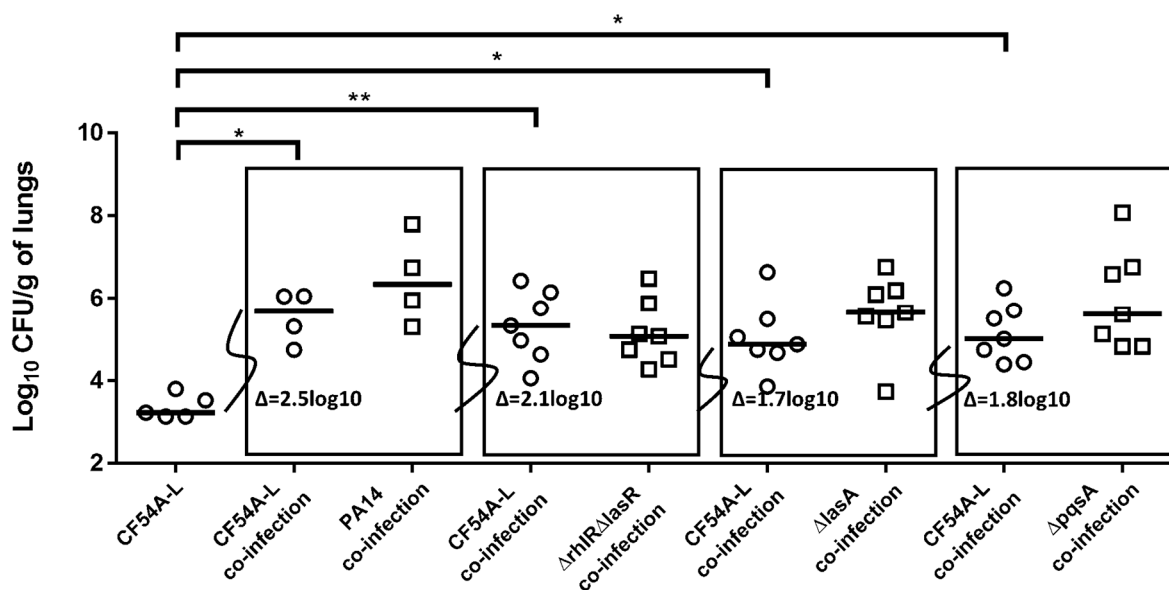
866 SEARCHING FOR *P. AERUGINOSA* VIRULENCE-ASSOCIATED FACTORS HELPING *S. AUREUS*
867 COLONIZATION

868 In an attempt to determine if a specific *P. aeruginosa* virulence-associated factor was
869 responsible for the promotion of *S. aureus* lung colonization, PA14 mutants displaying different
870 alterations (**Table 1**) were tested in the co-infection assay (all used at an inoculum of $\sim 2 \times 10^6$
871 CFU). *S. aureus* colonization was still improved when co-infecting with any of the PA14
872 mutants tested (PA14 Δ *rhlR* Δ *lasR*, 2.1 log₁₀ median increase; PA14 Δ *lasA*, 1.7 log₁₀ increase;
873 PA14 Δ *pqsA*, 1.8 log₁₀ increase) but the promotion was less than that observed with wild type
874 PA14 (2.5 log₁₀ increase) (**Figure 3**). No specific *P. aeruginosa* factors could be identified as
875 crucial for helping *S. aureus* colonization using this approach.



876
877 **Figure 2. Mouse pulmonary mono or co-infections with *S. aureus* and *P. aeruginosa*.**
878 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
879 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). CFUs retrieved from co-
880 infections are indicated by boxes. For co-infections, the starting inoculum was equivalent to the
881 sum of each inoculum used in mono-infections. The pairs tested were *P. aeruginosa* PAC54A

882 and *S. aureus* CF54A-L (A), and *P. aeruginosa* PA14 and *S. aureus* CF54A-L (B). The median
 883 for each group is indicated by the horizontal bar. Statistical differences between the median
 884 log₁₀ CFU per gram of lungs for mono and co-infections for both *P. aeruginosa* and *S. aureus*
 885 were determined with a Mann-Whitney test : NS, not statistically significant, p > 0.05; ***, p
 886 < 0.001.



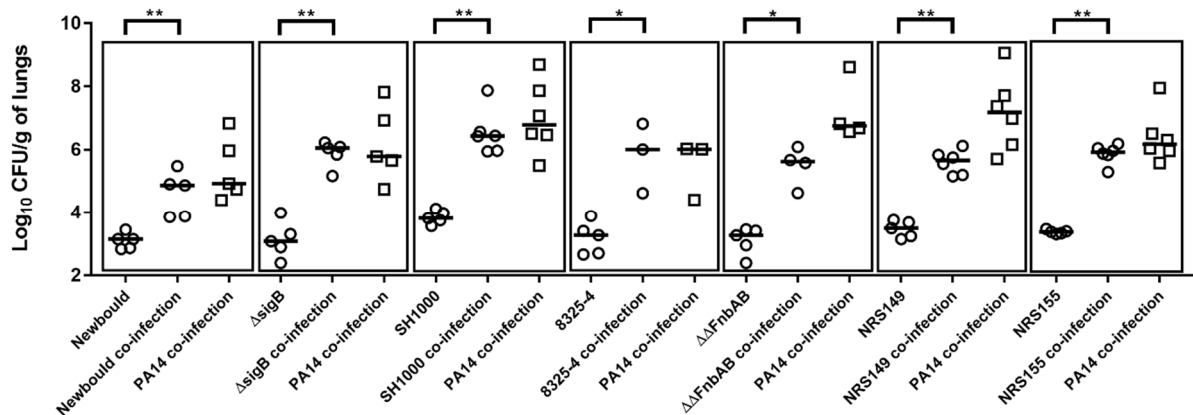
887
 888 **Figure 3. Mouse pulmonary mono or co-infections with *S. aureus* CF54-L and *P.***
 889 ***aeruginosa* PA14 and mutants.**

890 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
 891 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). CFUs retrieved from co-
 892 infections are indicated by boxes. For co-infections, the starting inoculum was equivalent to the
 893 sum of each inoculum used in mono-infections. The pairs tested were *S. aureus* CF54A-L and
 894 *P. aeruginosa* PA14; CF54A-L and PA14ΔrhIRΔlasR; CF54A-L and PA14ΔlasA; CF54A-L
 895 and PA14ΔpqsA. The median for each group is indicated by the horizontal bar. Statistical
 896 differences between the median log₁₀ CFU per gram of lungs for *S. aureus* CF54-L mono and
 897 co-infections were determined with a Mann-Whitney test : NS, not statistically significant, p >
 898 0.05; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

899

900 SEARCHING FOR *S. AUREUS* VIRULENCE-ASSOCIATED FACTORS PROMOTING ITS OWN
901 COLONIZATION DURING CO-INFECTION

902 Since it was determined that *P. aeruginosa* mutants showing some attenuation in virulence still
903 improved *S. aureus* colonization proportionally to their own colonization, the contribution of *S.*
904 *aureus* in this phenomenon was also examined using a similar approach. Co-infections were
905 performed using *P. aeruginosa* PA14 and various *S. aureus* mutants (all used at an inoculum of
906 2×10^6 CFU). The contribution of the global regulators SigB and Agr was investigated since
907 they both are major virulence regulators in SCVs and wild-type strains (Novick and Geisinger,
908 2008; Mitchell *et al.*, 2013b). However, when tested in the lung co-infection model,
909 Newbould Δ *sigB* colonization was increased by the presence of PA14, in a similar manner than
910 that observed for the *S. aureus* wild-type counterpart Newbould (**Figure 4**). Similarly, 8325-4
911 is a *S. aureus* strain naturally deficient for SigB activity because of its defective *rsbU* alleles.
912 Strain 8325-4 was thus compared to SH1000, an isogenic strain with a restored *rsbU* allele
913 (O'Neill, 2010). Again, PA14 positively affected colonization of either *S. aureus* strains (8325-
914 4 and SH1000) compared to *S. aureus* mono-infections. Next, using the same strain background
915 (8325-4) we investigated a mutant for the fibronectin-binding proteins A and B, which are
916 known multi-purpose adhesins for *S. aureus* (Josse, Laurent and Diot, 2017). Despite the
917 absence of FnbAB, **Figure 4** shows that the mechanism by which *P. aeruginosa* helps *S. aureus*
918 colonization of the lungs is still not impaired. The role of the *S. aureus* Agr system was then
919 examined. Agr is a global regulator of *S. aureus* virulence that influences expression of
920 exoproducts and surface proteins. Nevertheless, NRS155, an *agr*-null derivative of NRS149,
921 was still significantly helped in its lung colonization by *P. aeruginosa* PA14. In conclusion,
922 neither the alternative transcription factor SigB, the adhesins FnbAB or the Agr regulator seem
923 to contribute to the mechanism by which *P. aeruginosa* helps the colonization of the lungs by
924 *S. aureus*.



925

926 **Figure 4. Mono or mixed mouse pulmonary infections with *S. aureus* virulence mutants**
 927 **and *P. aeruginosa*.**

928 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
 929 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). CFUs retrieved from co-
 930 infections are indicated by boxes. For co-infections, the starting inoculum was equivalent to the
 931 sum of each inoculum used in mono-infections. The pairs tested were *S. aureus* Newbould and
 932 *P. aeruginosa* PA14; NewbouldΔsigB and PA14; SH1000 and PA14; 8325-4 and PA14Δ; 8325-
 933 4ΔΔfnbAB and PA14; NRS149 and PA14; NRS155 and PA14. The median for each group is
 934 indicated by the horizontal bar. Statistical differences between the median log₁₀ CFU per gram
 935 of lungs for every *S. aureus* mono and co-infections were determined with a Mann-Whitney
 936 test: NS, not statistically significant, p > 0.05; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

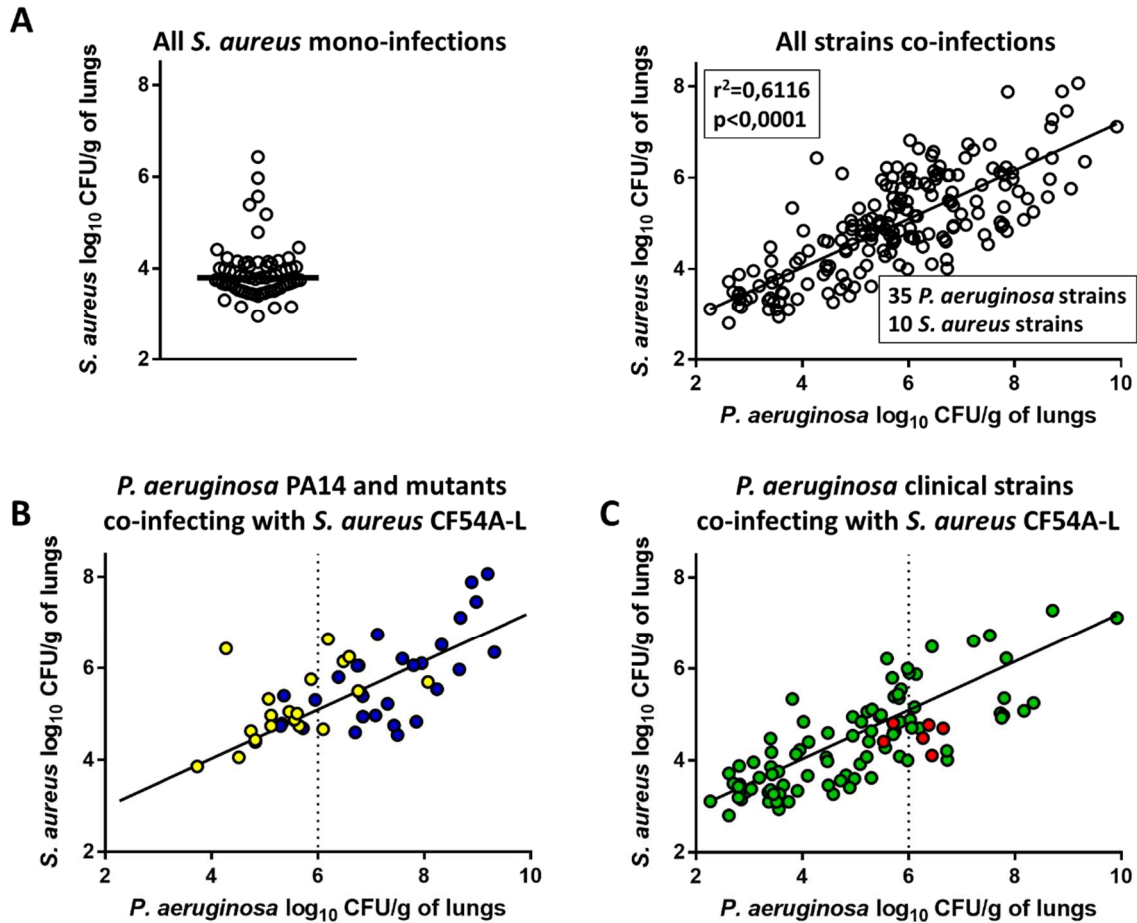
937 *P. AERUGINOSA* IMPROVES *S. AUREUS* COLONIZATION IN A DOSE-DEPENDANT MANNER

938 Following the previous results, we formulated the hypothesis that during a co-infection, the
 939 better *P. aeruginosa* can infect the lungs, the more *S. aureus* colonization is enhanced. To test
 940 this hypothesis, the pulmonary co-infection model was performed using a collection of clinical
 941 and mutant strains. We used 35 *P. aeruginosa* strains in combination with 10 *S. aureus* strains
 942 and different inoculum sizes were used for some strains for a total of 200 co-infections. For each
 943 experimental co-infection, the CFU counts in the lungs for *P. aeruginosa* and for *S. aureus* were
 944 determined after 24h and plotted in **Figure 5A**, which includes results using the *P. aeruginosa*

945 PA14 mutants and *S. aureus* mutants of **Figure 3** and **4**, respectively. Based on **Figure 5A**, it
946 was clear that the colonization success of *P. aeruginosa* increased in a dose-dependant manner
947 the colonization of *S. aureus* (**Figure 5A**, right panel, linear regression $R^2 = 0.6116$, $p < 0.0001$).
948 **Figure 5A** also shows that most of the *S. aureus* strains used in this model do not colonize the
949 lungs very efficiently by their own when tested in a mono-infection (median \log_{10} CFU/g of
950 lung of 3.8, **Figure 5A** left panel). This shows once again that it is the colonization capacity of
951 *P. aeruginosa* that drives upward the colonization of *S. aureus* and not the other way around.

952 To get a better insight of the correlation between *P. aeruginosa* and *S. aureus* colonization, the
953 data were split in different *P. aeruginosa* subgroups. First, results for *P. aeruginosa* PA14 and
954 mutants (all used at an inoculum of $\sim 2.0 \times 10^6$ CFU) in co-infection with *S. aureus* strain
955 CF54A-L are shown in **Figure 5B**. While infection by the mutant strains was less productive
956 than that of the parent PA14 (generally yielding less than 10^7 CFU/g of lungs), colonization of
957 *S. aureus* was still proportional and relative to that of *P. aeruginosa*. Then, plotting data for *P.*
958 *aeruginosa* clinical strains (all used at an inoculum of $\sim 2 \times 10^7$ CFU) in co-infection with *S.*
959 *aureus* strain CF54A-L (shown to be susceptible to *P. aeruginosa* antagonism *in vitro*, **Figure**
960 **1E, 1F**), demonstrated once again the same correlation (**Figure 5C**). Also, highlighting data for
961 *P. aeruginosa* strain PAC54A (the non-antagonistic strain *in vitro*, **Figure 1C, 1D**), also fitted
962 the linear regression (**Figure 5C**, red symbols) although this *P. aeruginosa* strain was less
963 productive and accordingly, *S. aureus* colonization also occurred at a lesser degree. As for the
964 *P. aeruginosa* PA14 mutants deficient in a variety of virulence-associated products (**Figure 3**
965 and **5B**), most *P. aeruginosa* clinical strains yielded less than 10^7 CFU/g of lungs (**Figure 5C**).
966 Besides, data for specific *S. aureus* strains and mutants, all in co-infection with *P. aeruginosa*
967 PA14, are plotted in **Figure S3**. No particular *S. aureus* mutant seemed to diverge from the
968 trend described above.

969 Overall, each *P. aeruginosa* strain tested enhanced *S. aureus* colonization proportionally to their
970 own ability to infect the lungs. *P. aeruginosa* clinical strains generally yielded lower levels of
971 lung colonization compared to the prototypic strain PA14.



972

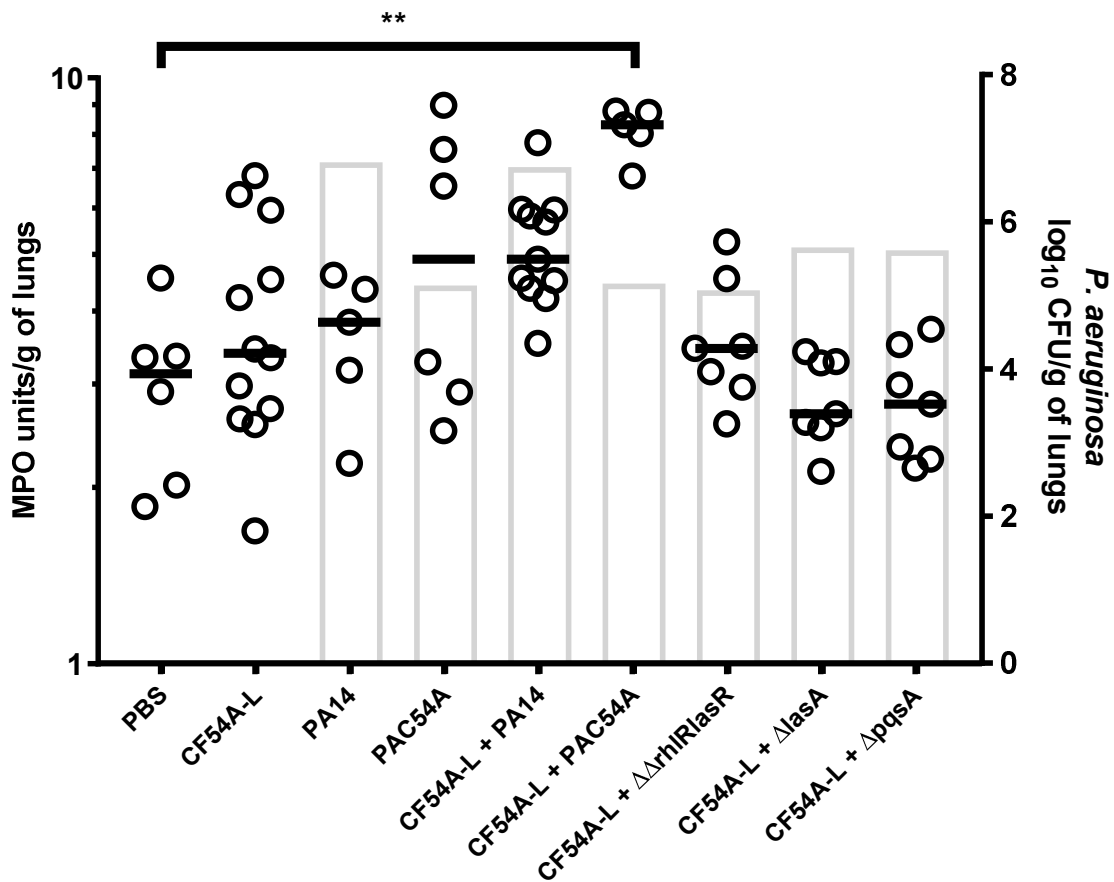
973 **Figure 5. Compilation of mixed mouse pulmonary infections with *S. aureus* and *P.***
 974 ***aeruginosa*.**

975 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
 976 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). For co-infections, the starting
 977 inoculum was equivalent to the sum of each inoculum used in mono-infections. The strains
 978 tested were *S. aureus* CF07-L, CF54A-L and CF112A-L at an inoculum of 2×10^6 CFU (A –
 979 left panel) CF07-L, CF54A-L, CF112A-L and every *S. aureus* strains indicated in T1 co-
 980 infecting with *P. aeruginosa* PA14, PAC54A, PAC112A, all PA14 mutants indicated in T1 and
 981 29 clinical isolates (A – left panel); CF54A-L co-infecting with PA14 and its associated
 982 virulence mutants at an inoculum of 2×10^6 CFU (B); CF54A-L co-infecting with every *P.*
 983 *aeruginosa* clinical strains, including PAC54A, at an inoculum of 2×10^7 CFU (C). Statistical

984 significance of the trendline of all strains co-infections was determined with a linear regression
985 test. Blue dots represent PA14 co-infections; yellow dots represent PA14 virulence mutants co-
986 infections; green dots represents clinical *P. aeruginosa* strains co-infections; red dots represents
987 PAC54A co-infections.

988 THE CONTRIBUTION OF *P. AERUGINOSA* TO *S. AUREUS* COLONIZATION IS INDEPENDENT OF
989 INFLAMMATION

990 Since no *P. aeruginosa* or *S. aureus* virulence factors could be identified as an essential
991 determinant in the mechanism by which *P. aeruginosa* stimulates *S. aureus* colonization, other
992 possible causes were investigated. It was thus hypothesized that *P. aeruginosa* could exacerbate
993 a pro-inflammatory response, which could help *S. aureus* colonization. MPO activity was
994 therefore measured for a series of co-infections in the mouse since it was recently found to be a
995 good indicator of inflammation (Côté-Gravel *et al.* 2016). *S. aureus* CF54A-L was used in all
996 co-infections together with a variety of *P. aeruginosa* strains showing different levels of
997 virulence and colonization. All *P. aeruginosa* strains were compared, using an inoculum of ~ 2
998 $\times 10^6$ CFU for PA14 and mutants and an inoculum of $\sim 2 \times 10^7$ CFU for PAC54A and *P.*
999 *aeruginosa* clinical strains. Interestingly, only the co-infection by *P. aeruginosa* PAC54A and
1000 *S. aureus* CF54A-L resulted in a significantly higher MPO score (*vs* the PBS control) even
1001 though the level of colonization for both species in that co-infection was much less than that
1002 achieved by the PA14-CF54A-L pair (**Figure 6**). This clearly indicates that a high colonization
1003 of *P. aeruginosa* do not necessarily translate in a high MPO score and that the level of
1004 inflammation does not correlate with the ability of *P. aeruginosa* to promote *S. aureus*
1005 colonization. Also inversely, low inflammation (as seen with the PA14 co-infections) does not
1006 better promote *S. aureus* colonization. Hence, the level of inflammation caused by *P. aeruginosa*
1007 or the co-infection does not seem to be involved in the mechanism by which *P. aeruginosa* helps
1008 *S. aureus* colonization.



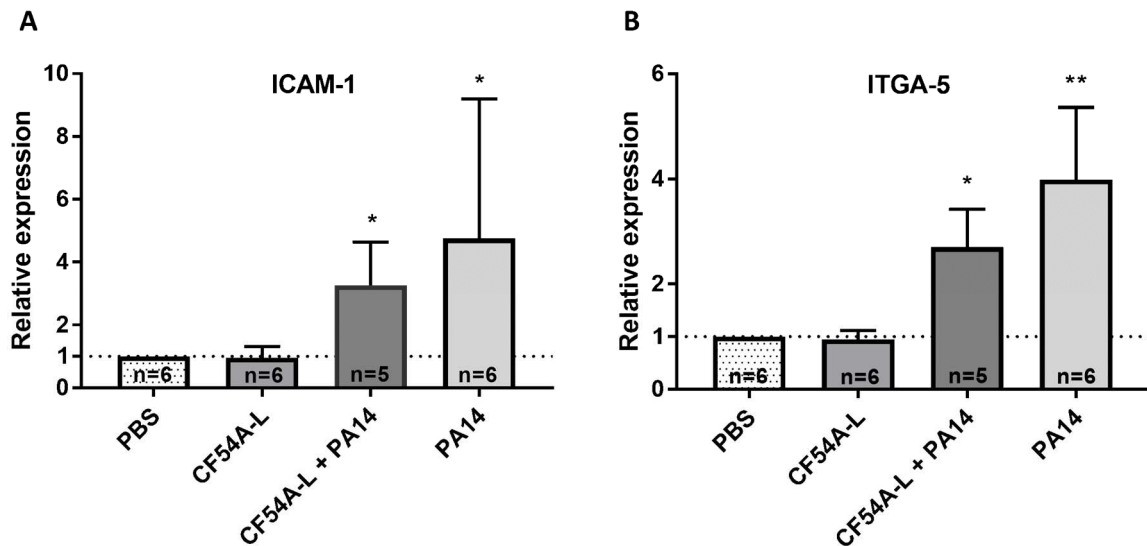
1009

1010 **Figure 6. MPO activity of lungs mono or co-infected with *S. aureus* and *P. aeruginosa*.**

1011 MPO units were determined using an enzymatic assay. CFUs were determined 24 h post-
 1012 infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented with polymyxin B (*S. aureus*) or
 1013 with rifampicin (*P. aeruginosa*). For co-infections, the starting inoculum was equivalent to the
 1014 sum of each inoculum used in mono-infections. The strains tested were *S. aureus* CF54A-L; *P.*
 1015 *aeruginosa* PA14, PA14Δ*rhlR*Δ*lasR*, PA14Δ*lasA*, PA14Δ*pqsA* and PAC54A. The median for
 1016 MPO activity in each group is indicated by the horizontal bar, while open dots represent the
 1017 MPO activity for an individual lung. Columns indicate the median *P. aeruginosa* colonization
 1018 for each group. Statistical differences between the median MPO activity for PBS control and
 1019 the other groups were determined with a Kruskal-Wallis test : NS, not statistically significant,
 1020 p > 0.05; **, p < 0.01

1021 *P. AERUGINOSA* INDUCES THE OVEREXPRESSION OF KNOWN *S. AUREUS* CELL SURFACE RECEPTORS

1022 To explain the promotion of *S. aureus* colonization by *P. aeruginosa*, neither virulence-
1023 associated factors or the level of inflammation could be identified as a contributor to this
1024 phenomenon and we looked for other possibilities inspired by knowledge surrounding bacteria
1025 and viruses co-infections. Indeed, it has been shown that rhinoviruses can promote cellular
1026 ICAM-1 and integrin $\alpha_5\beta_1$ expression (Passariello *et al.*, 2006), which are in turn associated or
1027 known cell surface receptors for *S. aureus*. Therefore, we verified by RT-qPCR if *P. aeruginosa*
1028 could induce a similar effect on the lung tissue during infections. **Figure 7A** shows that a *P.*
1029 *aeruginosa* PA14 mono- or co-infection with *S. aureus* CF54A-L induces a significant increase
1030 in the expression of ICAM-1 in comparison to the PBS control. In addition, the expression of
1031 ITGA-5, which associates with the β_1 subunit to form the $\alpha_5\beta_1$ integrin, was also enhanced by
1032 the co-infection (**Figure 7B**), while on the other hand, a mono-infection by *S. aureus* CF54A-L
1033 did not change the level of expression of either ICAM-1 or ITGA-5. For each biological sample
1034 tested, a GAPDH internal control was added to ensure adequate RNA integrity and for relative
1035 quantification of gene expression levels. At least five biological replicates were produced for
1036 each infection group. Hence, PA14, whether during a mono- or co-infection, appears to
1037 significantly stimulate the expression of these two cellular genes, which could in turn contribute
1038 to *S. aureus* colonization.



1039

1040 **Figure 7. Relative expression of cellular ICAM-1 (A) and ITGA-5 (B) genes in lung tissues**
 1041 **during mono or co-infections with *S. aureus* CF54A-L and *P. aeruginosa* PA14.**

1042 Total RNA was extracted from lung tissues 24h post-infection. Expression was quantified by
 1043 RT-qPCR and normalized to the PBS control. GAPDH expression was used as an internal
 1044 control for each individual sample. Quantity of biological replicates (n) is indicated for each
 1045 group. Statistical differences between the relative expression of both genes in the infection
 1046 groups compared to that PBS control group was determined with a Kruskal-Wallis test. NS, not
 1047 statistically significant, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

1048 2.2.5 DISCUSSION

1049 This study aimed to gain a better understanding of the interactions between *P. aeruginosa* and
 1050 *S. aureus*, which are allegedly antagonistic to each other although they are commonly co-
 1051 isolated from chronically-infected CF patients. Indeed, we previously demonstrated that clinical
 1052 co-isolates do not necessarily display the same properties as prototypical antagonistic strains *in*
 1053 *vitro* (Fugère *et al.*, 2014). Studying further *P. aeruginosa* – *S. aureus* co-isolates should provide
 1054 the necessary data to close the gap between the seemingly opposite *in vitro* and *in vivo*
 1055 behaviors. Coherently with data displayed in our precedent study, we demonstrated here that
 1056 co-isolates do not always antagonize themselves *in vitro*. Such results indicate that *P.*

1057 *aeruginosa* may become less aggressive toward *S. aureus* in the CF lung environment. This may
1058 either be the result of an adaptation toward *S. aureus* or to the hostile host environment and
1059 inflammatory response. By reducing its production of alkyl-quinolones and other QS factors, *P.*
1060 *aeruginosa* is less likely to trigger an intense immune response. At the same time, with a reduced
1061 production of HQNO and alkyl-quinolones, *P. aeruginosa* dampens its inhibitory effect against
1062 *S. aureus* (Hoffman *et al.*, 2006). This could be the case for *P. aeruginosa* PAC54A, which
1063 produces very little HQNO and other QS factors compared to PA14 (Fugère *et al.* 2014;
1064 supplemental material), and subsequently displays no antagonism toward its *S. aureus* co-isolate
1065 CF54A-L (**Figure 1C, 1D**). Besides, PAC22A, which produces a similar amount of HQNO
1066 compared to that of PA14 (Fugère *et al.* 2014; supplemental material), also did not reduce the
1067 viability of its co-isolate CF22A-L although it still occasioned the formation of SCVs (**Figure**
1068 **1G, 1H**). This shows the complex interactions that can demonstrate these bacterial species.
1069 Overall, our findings establish that contrary to the long-held belief, *P. aeruginosa* does not
1070 always antagonize *S. aureus in vitro* and the effect of *P. aeruginosa* on *S. aureus* viability and
1071 phenotypes can translate in multiple scenarios.

1072 To our knowledge, very few studies, if not any, had specifically examined the interaction
1073 between *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains co-isolated from CF patients. Since co-isolates do
1074 not interact as prototypical strains *in vitro*, we hypothesized that co-isolates could also behave
1075 differently *in vivo*, which in turn could provide some explanations on why *S. aureus* and *P.*
1076 *aeruginosa* are frequently co-isolated from the CF lung. According to our findings, it seems
1077 that the nature of the interaction between *P. aeruginosa* and *S. aureus in vitro* is not a good
1078 indicator of the outcome of a co-infection *in vivo*. Unexpectedly, the extent of *S. aureus*
1079 colonization during a co-infection did not correlate with a lack of antagonism *in vitro*, but rather
1080 it did correlate with the capacity of *P. aeruginosa* to infect the lungs. Also, using a series of *P.*
1081 *aeruginosa* PA14 mutants, no virulence-associated factor was specifically identified as
1082 responsible for the promotion of *S. aureus* colonization during a co-infection. Still, as the ability
1083 of the *P. aeruginosa* clinical strains to infect and promote *S. aureus* co-colonization ranged from
1084 low to high, it would be important to identify *P. aeruginosa* properties that may be conserved
1085 among the best colonizers, and therefore the best inducer of *S. aureus* colonization. Whole-

1086 genome sequencing is currently underway to compare *P. aeruginosa* isolates that are “low” and
1087 “high” inducers of *S. aureus* colonization to identify *P. aeruginosa* factors or mutations that
1088 best profit to *S. aureus*.

1089 The contribution of *S. aureus* key virulence regulators or effectors in the outcome of *P.*
1090 *aeruginosa-S. aureus* co-infections was also investigated in this study. It is known that *S. aureus*
1091 can adopt the SCV phenotype in presence of prototypic *P. aeruginosa* strains which produce
1092 HQNO (Hoffman *et al.*, 2006). SCVs are proficient in the invasion of non-professional
1093 phagocytic cell, which in turn helps to evade the immune system (Mitchell, Grondin, *et al.*,
1094 2011). It was therefore possible that *P. aeruginosa* enhances *S. aureus* colonization *in vivo* by
1095 inducing SCV-like properties. Since the alternative transcription factor SigB is a dominant
1096 regulator of virulence in SCVs (Mitchell *et al.*, 2013b), we tested the colonization ability of two
1097 SigB deleted or altered mutants in the presence of *P. aeruginosa*. Using such an approach, we
1098 were not able to demonstrate a contribution of *S. aureus* SigB in the outcome of the co-infection
1099 in mice. However, since the murine infection model was acute and not chronic, it is possible
1100 that in such conditions, induction of SCVs, cellular invasion and intracellular replication might
1101 have been less than significant. Alternatively, another hypothesis was that *P. aeruginosa* might
1102 affect and positively upregulate virulence in *S. aureus* but again, an *agr* mutant was not altered
1103 in its ability to co-colonize the lung with *P. aeruginosa* even though Agr is an important
1104 virulence activator in prototypic *S. aureus* strains (Novick and Geisinger, 2008).

1105 These results indicate that *P. aeruginosa* is probably not directly affecting *S. aureus* virulence.
1106 Since *P. aeruginosa* inhibits or is at best indifferent toward *S. aureus in vitro*, we then can only
1107 infer that the environment must be modified by *P. aeruginosa* in a way that it promotes *S. aureus*
1108 colonization *in vivo*. *P. aeruginosa* can induce inflammation with a panel of different virulence
1109 factors (Wieland *et al.*, 2002; Lin and Kazmierczak, 2017). While inflammation is necessary for
1110 curing bacterial infections, an over-stimulated inflammatory response can provoke host tissue
1111 damage and alter bacterial clearance (Lin and Kazmierczak, 2017). Also, we have shown that
1112 activation of NF- κ B by LPS and TNF- α increases *S. aureus* invasion of pulmonary cells cultured
1113 *in vitro* (Mitchell, Grondin, *et al.*, 2011). It is therefore possible that inflammation provoked by

1114 *P. aeruginosa* can contribute to *S. aureus* colonization. However, using MPO activity as a
1115 marker for inflammation, we showed here that the *P. aeruginosa* strain inducing the most
1116 inflammation in the mice lungs was PAC54A, which was not as efficient as the prototypic strain
1117 PA14 at promoting *S. aureus* infection. Therefore, it was not possible to associate the level of
1118 inflammation with the ability of *P. aeruginosa* to enhance *S. aureus* colonization.

1119 Rhinoviruses have already been shown to promote *S. aureus* colonization *in vivo*. Explicitly,
1120 rhinoviruses increase *S. aureus* colonization by a mechanism involving the release of IL-6, IL-
1121 8 and the overexpression of ICAM-1 (Passariello *et al.*, 2006). Moreover, rhinoviruses also
1122 upregulate integrin $\alpha_5\beta_1$ transcription (Kim *et al.*, 2015). This integrin is one of the main
1123 pathway by which *S. aureus* can invade non-professional phagocytic cells (Josse, Laurent and
1124 Diot, 2017). Hence, based on such a precedent for *in vivo* cooperation between two
1125 microorganisms, we investigated the expression of ICAM-1 and ITGA-5 (a marker for integrin
1126 $\alpha_5\beta_1$) in the mouse lung tissue infected by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Interestingly, *P.*
1127 *aeruginosa* mono- or co-infections could indeed increase expression of both host cell
1128 components, whereas a mono-infection with *S. aureus* did not (**Figure 7**). ICAM-1 is
1129 responsible for the transmigration of leukocytes during an infection, which occurs through the
1130 endothelium to the site of the lesions (Springer, 1990). *P. aeruginosa* induces its overexpression,
1131 possibly through tissue damages and the inflammation process. Likewise, Gram negative LPS
1132 was shown to induce expression of ITGA-5 (Roman *et al.*, 2004; Sampaio *et al.*, 2010). It is
1133 thus plausible that *S. aureus* might benefit from these transcriptional changes to adhere to host
1134 cells and increase its colonization of the lung tissue when *P. aeruginosa* is present.

1135 *S. aureus* FnBPs are bacterial adhesins known to interact with integrin $\alpha_5\beta_1$ through fibronectin
1136 (Mitchell *et al.*, 2008). Since we showed that the colonization of *S. aureus* lacking FnBPs is still
1137 promoted by a co-infection by *P. aeruginosa*, such a *S. aureus* mutant must have other means
1138 to interact with the host cells. For example, the *S. aureus* protein EAP, which also binds
1139 fibronectin (Sinha and Fraunholz, 2010), can perhaps compensate for a lack of FnBPs. Also, *S.*
1140 *aureus* teichoic acids were shown to contribute to binding to endothelial cells (Weidenmaier *et*
1141 *al.*, 2005). Consequently, a *S. aureus* strain lacking FnBPs should still adhere to host cells and

1142 colonize tissues (Josse, Laurent and Diot, 2017). Furthermore, ICAM-1 and integrin $\alpha_5\beta_1$ can
1143 both individually allow *S. aureus* host cell binding (Sinha *et al.*, 1999; Passariello *et al.*, 2006),
1144 and according to the mouse ENCODE transcriptome data, ICAM-1 is up to 10 times more
1145 prevalent than ITGA-5 in mice lungs (Yue *et al.*, 2014). Likewise, ICAM-1 is overexpressed in
1146 comparison to ITGA-5 in the human lungs (Fagerberg *et al.*, 2014). Hence, prototypic *S. aureus*
1147 and the FnBPs mutant may both have predominantly interacted with ICAM-1 for colonization
1148 in the murine lung infection model.

1149 Overall, we showed that *P. aeruginosa* promotes *S. aureus* colonization in a dose-dependant
1150 manner *in vivo*. The mechanism could involve inflammation and induction of ICAM-1 and
1151 ITGA-5, which would allow a better adhesion and colonization of *S. aureus*. Further
1152 experiments are required to identify exactly how *P. aeruginosa* can modulate the lung tissue to
1153 promote *S. aureus* colonization.

1154 2.2.6 ACKNOWLEDGMENTS

1155 This study was also supported by a grant from Cystic Fibrosis Canada. GM received
1156 studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the
1157 Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies. We also thank E. Deziel (INRS-
1158 Institut Armand Frappier, Laval, QC, Canada.) for providing the series of *P. aeruginosa* PA14
1159 mutants.

1160 2.2.7 REFERENCES

1161 Ahuja, N., Kumar, P. and Bhatnagar, R. (2004) 'The Adenylate Cyclase Toxins', *Critical*
1162 *Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis, 30(3), pp. 187–196. doi:
1163 10.1080/10408410490468795.

1164 Archer, N. K. *et al.* (2011) '*Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in
1165 human disease.', *Virulence*, 2(5), pp. 445–59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.

- 1166 Boulanger, S. *et al.* (2015) ‘Bactericidal Effect of Tomatidine-Tobramycin Combination against
1167 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced by
1168 Interspecific Small-Molecule Interactions.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12),
1169 pp. 7458–64. doi: 10.1128/AAC.01711-15.
- 1170 Boyd, A. and Chakrabarty, A. M. (1995) ‘*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the
1171 alginate exopolysaccharide’, *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), pp. 162–168. doi:
1172 10.1007/BF01569821.
- 1173 Carnoy, C. *et al.* (1993) ‘Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients
1174 with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*.’, *American journal of*
1175 *respiratory cell and molecular biology*, 9(3), pp. 323–34. doi: 10.1165/ajrcmb/9.3.323.
- 1176 Carnoy, C. *et al.* (1994) ‘*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human
1177 respiratory mucus glycoproteins.’, *Infection and immunity*, 62(5), pp. 1896–900. Available at:
1178 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168955> (Accessed: 23 October 2016).
- 1179 Cigana, C. *et al.* (2018) ‘*Staphylococcus aureus* Impacts *Pseudomonas aeruginosa* Chronic
1180 Respiratory Disease in Murine Models’, *Journal of Infectious Diseases*, 217(6), pp. 933–942.
1181 doi: 10.1093/infdis/jix621.
- 1182 CLSI (2018) ‘Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for
1183 antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document
1184 M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA’.
- 1185 Côté-Gravel, J. *et al.* (2016) ‘Characterization of a *vraG* Mutant in a Genetically Stable
1186 *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant and Preliminary Assessment for Use as a Live-
1187 Attenuated Vaccine against Intramammary Infections Characterization of a *vraG* Mutant in a
1188 Genetically Stable’. doi: 10.1371/journal.pone.0166621.

- 1189 Cystic Fibrosis Canada, C. F. (2018) *The Canadian Cystic Fibrosis Registry Annual Report*.
1190 Available at: www.cysticfibrosis.ca. (Accessed: 11 December 2018).
- 1191 Dekimpe, V. and Déziel, E. (2009) ‘Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas*
1192 *aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors.’, *Microbiology*
1193 (*Reading, England*), 155(Pt 3), pp. 712–23. doi: 10.1099/mic.0.022764-0.
- 1194 Déziel, E. *et al.* (2004) ‘Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines
1195 (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication.’,
1196 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.
1197 1339–44. doi: 10.1073/pnas.0307694100.
- 1198 Fagerberg, L. *et al.* (2014) ‘Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide
1199 Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics’, *Molecular & Cellular*
1200 *Proteomics*, 13(2), pp. 397–406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- 1201 Folkesson, A. *et al.* (2012) ‘Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis
1202 airway: an evolutionary perspective’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group,
1203 10(12), pp. 841–51. doi: 10.1038/nrmicro2907.
- 1204 Fugère, A. *et al.* (2014) ‘Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of
1205 *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients.’, *PloS*
1206 *one*. Public Library of Science, 9(1), p. e86705. doi: 10.1371/journal.pone.0086705.
- 1207 Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994) ‘Quorum sensing in bacteria: the
1208 LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.’, *Journal of*
1209 *bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 176(2), pp. 269–75. Available at:
1210 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288518> (Accessed: 25 December 2018).
- 1211 Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. W. (2013) ‘*Pseudomonas aeruginosa*: new insights into

- 1212 pathogenesis and host defenses’, *Pathogens and Disease*. Oxford University Press, 67(3), pp.
1213 159–173. doi: 10.1111/2049-632X.12033.
- 1214 Goerke, C. and Wolz, C. (2010) ‘Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis
1215 lung.’, *International journal of medical microbiology: IJMM*, 300(8), pp. 520–5. doi:
1216 10.1016/j.ijmm.2010.08.003.
- 1217 Gómez, M. I. and Prince, A. (2007) ‘Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas*
1218 infections in cystic fibrosis.’, *Current opinion in pharmacology*, 7(3), pp. 244–51. doi:
1219 10.1016/j.coph.2006.12.005.
- 1220 Harun, S. N. *et al.* (2016) ‘A systematic review of studies examining the rate of lung function
1221 decline in patients with cystic fibrosis’, *Paediatric Respiratory Reviews*, 20, pp. 55–66. doi:
1222 10.1016/j.prrv.2016.03.002.
- 1223 Hoffman, L. R. *et al.* (2006) ‘Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to
1224 growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*.’, *Proceedings of the National Academy of*
1225 *Sciences of the United States of America*, 103(52), pp. 19890–5. doi: 10.1073/pnas.0606756104.
- 1226 Hotterbeekx, A. *et al.* (2017) ‘*In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas*
1227 *aeruginosa* and *Staphylococcus* spp.’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*.
1228 Frontiers Media SA, 7, p. 106. doi: 10.3389/fcimb.2017.00106.
- 1229 Hubert, D. *et al.* (2013) ‘Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with
1230 *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis’, *Journal of*
1231 *Cystic Fibrosis*. Elsevier, 12(5), pp. 497–503. doi: 10.1016/j.jcf.2012.12.003.
- 1232 Ji, G., Beavis, R. and Novick, R. P. (1997) ‘Bacterial interference caused by autoinducing
1233 peptide variants.’, *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), pp. 2027–30. Available at:
1234 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197262> (Accessed: 11 December 2018).

- 1235 Josse, J., Laurent, F. and Diot, A. (2017) 'Staphylococcal adhesion and host cell invasion:
1236 Fibronectin-binding and other mechanisms', *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–8. doi:
1237 10.3389/fmicb.2017.02433.
- 1238 Junge, S. *et al.* (2016) 'Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients
1239 with Persistent *Staphylococcus aureus*', *PLOS ONE*. Edited by A. Omri. Public Library of
1240 Science, 11(11), p. e0166220. doi: 10.1371/journal.pone.0166220.
- 1241 Kahl, B. C., Becker, K. and Löffler, B. (2016) 'Clinical Significance and Pathogenesis of
1242 Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections.', *Clinical microbiology reviews*.
1243 American Society for Microbiology, 29(2), pp. 401–27. doi: 10.1128/CMR.00069-15.
- 1244 Kim, T.-K. *et al.* (2015) 'A systems approach to understanding human rhinovirus and influenza
1245 virus infection', *Virology*. Academic Press, 486, pp. 146–157. doi:
1246 10.1016/J.VIROL.2015.08.014.
- 1247 Kreda, S. M., Davis, C. W. and Rose, M. C. (2012) 'CFTR, mucins, and mucus obstruction in
1248 cystic fibrosis.', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory
1249 Press, 2(9), p. a009589. doi: 10.1101/cshperspect.a009589.
- 1250 Lamont, I. L. *et al.* (2002) 'Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor
1251 production in *Pseudomonas aeruginosa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
1252 99(10), pp. 7072–7077. doi: 10.1073/pnas.092016999.
- 1253 Liberati, N. T. *et al.* (2006) *An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa*
1254 *strain PA14 transposon insertion mutants*. Available at:
1255 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511100103 (Accessed: 11 December 2018).
- 1256 Lightbown, J. W. and Jackson, F. L. (1956) 'Inhibition of cytochrome systems of heart muscle
1257 and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-

- 1258 oxides.’, *The Biochemical journal*, 63(1), pp. 130–7. Available at:
1259 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13315258> (Accessed: 25 July 2017).
- 1260 Limoli, D. H. *et al.* (2016) ‘*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection
1261 is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes’, *European Journal*
1262 *of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, 35(6), pp. 947–
1263 953. doi: 10.1007/s10096-016-2621-0.
- 1264 Limoli, D. H. *et al.* (2017) ‘*Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes
1265 Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection.’,
1266 *mBio*. American Society for Microbiology (ASM), 8(2). doi: 10.1128/mBio.00186-17.
- 1267 Lin, C. K. and Kazmierczak, B. I. (2017) ‘Inflammation: A Double-Edged Sword in the
1268 Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection.’, *Journal of innate immunity*, 9(3), pp. 250–
1269 261. doi: 10.1159/000455857.
- 1270 Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. (2002) ‘Lung Infections Associated with Cystic
1271 Fibrosis’, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 194–222. doi: 10.1128/CMR.15.2.194-
1272 222.2002.
- 1273 Lyon, G. J. *et al.* (2000) ‘Rational design of a global inhibitor of the virulence response in
1274 *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-
1275 histidine kinase, AgrC.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*
1276 *of America*. National Academy of Sciences, 97(24), pp. 13330–5. doi:
1277 10.1073/pnas.97.24.13330.
- 1278 MacDougall, C. *et al.* (2005) ‘*Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* , and
1279 Fluoroquinolone Use’, *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), pp. 1197–1210. doi:
1280 10.3201/eid1108.050116.

1281 Machan, Z. A. *et al.* (1992) '2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent
1282 produced by *Pseudomonas aeruginosa*.', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 30(5), pp.
1283 615–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1493979> (Accessed: 25 July 2017).

1284 Marshall, B. C. and Carroll, K. C. (1991) 'Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and
1285 host defenses in cystic fibrosis.', *Seminars in respiratory infections*, 6(1), pp. 11–8. Available
1286 at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909452> (Accessed: 23 October 2016).

1287 Merino, N. *et al.* (2009) 'Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*',
1288 *Journal of Bacteriology*, 191(3), pp. 832–843. doi: 10.1128/JB.01222-08.

1289 Mitchell, G. *et al.* (2008) '*Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-
1290 bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants
1291 isolated from cystic fibrosis patients', *Molecular Microbiology*, 70(6), pp. 1540–1555. doi:
1292 10.1111/j.1365-2958.2008.06511.x.

1293 Mitchell, G. *et al.* (2010) '*Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-
1294 colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-
1295 hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide.', *BMC microbiology*, 10, p. 33. doi: 10.1186/1471-2180-
1296 10-33.

1297 Mitchell, G., Grondin, G., *et al.* (2011) 'Infection of polarized airway epithelial cells by normal
1298 and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal
1299 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF- κ B',
1300 *Infection and Immunity*, 79(9), pp. 3541–3551. doi: 10.1128/IAI.00078-11.

1301 Mitchell, G., Gattuso, M., *et al.* (2011) 'Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus*
1302 *aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells.', *Antimicrobial agents*
1303 *and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 55(5), pp. 1937–45. doi:
1304 10.1128/AAC.01468-10.

- 1305 Mitchell, G. *et al.* (2012) ‘Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against
1306 multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression’, *Journal of*
1307 *Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), pp. 559–568. doi: 10.1093/jac/dkr510.
- 1308 Mitchell, G. *et al.* (2013a) ‘SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus*
1309 *aureus* Small-Colony Variants’, *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0065018.
- 1310 Mitchell, G. *et al.* (2013b) ‘SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus*
1311 *aureus* Small-Colony Variants’, *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0065018.
- 1312 Moisan, H. *et al.* (2006a) ‘Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-
1313 colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB.’, *Journal of*
1314 *bacteriology*, 188(1), pp. 64–76. doi: 10.1128/JB.188.1.64-76.2006.
- 1315 Moisan, H. *et al.* (2006b) ‘Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-
1316 colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB’, *Journal of*
1317 *Bacteriology*, 188(1), pp. 64–76. doi: 10.1128/JB.188.1.64-76.2006.
- 1318 Novick, R. P. (2003) ‘Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal
1319 virulence’, *Molecular Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 48(6), pp. 1429–1449. doi:
1320 10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.
- 1321 Novick, R. P. and Geisinger, E. (2008) ‘Quorum Sensing in Staphylococci’, *Annual Review of*
1322 *Genetics*. Annual Reviews , 42(1), pp. 541–564. doi:
1323 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- 1324 O’Neill, A. J. (2010) ‘*Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: comparative genome
1325 sequences of key laboratory strains in staphylococcal research’, *Letters in Applied*
1326 *Microbiology*, 51(3), pp. 358–361. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02885.x.
- 1327 Otto, M., Steele-Mortimer, O. and Subtil, A. (2014) ‘*Staphylococcus aureus* toxins’, *Current*

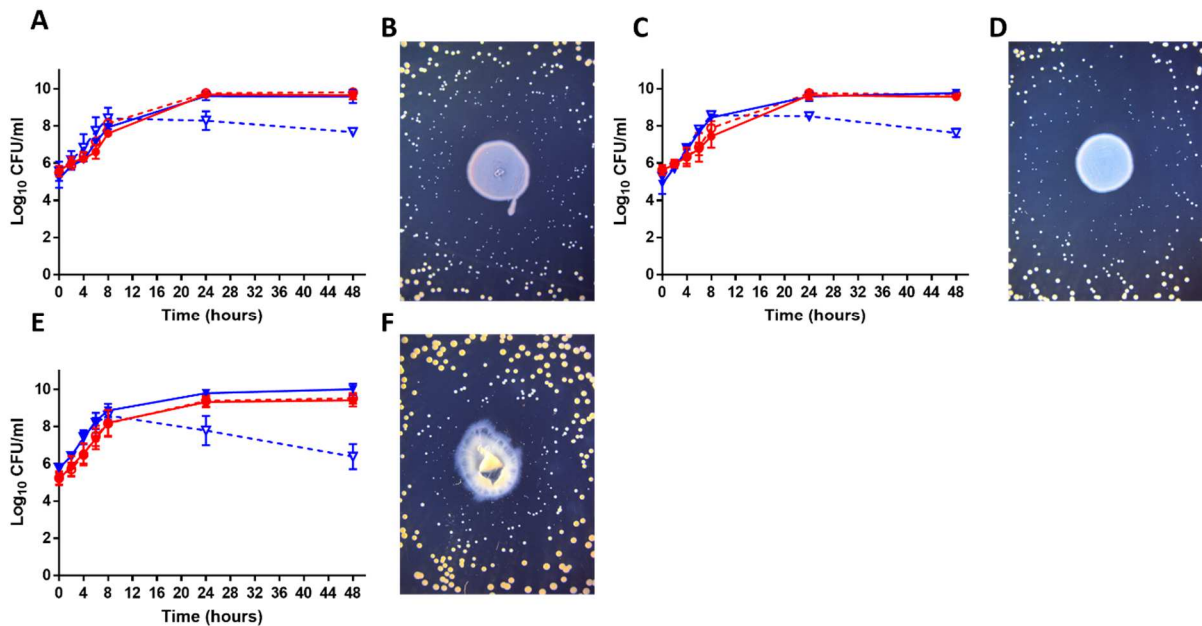
- 1328 *Opinion in Microbiology*, 17, pp. 32–37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- 1329 Palmer, K. L. *et al.* (2005) ‘Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of
1330 *Pseudomonas aeruginosa* physiology.’, *Journal of bacteriology*, 187(15), pp. 5267–77. doi:
1331 10.1128/JB.187.15.5267-5277.2005.
- 1332 Parkins, M. D., Rendall, J. C. and Elborn, J. S. (2012) ‘Incidence and Risk Factors for
1333 Pulmonary Exacerbation Treatment Failures in Patients With Cystic Fibrosis Chronically
1334 Infected With *Pseudomonas aeruginosa*’, *Chest*, 141(2), pp. 485–493. doi: 10.1378/chest.11-
1335 0917.
- 1336 Passariello, C. *et al.* (2006) ‘Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus*
1337 into non-fully permissive cultured pneumocytes’, *Microbes and Infection*, 8(3), pp. 758–766.
1338 doi: 10.1016/j.micinf.2005.09.013.
- 1339 Pastar, I. *et al.* (2013) ‘Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and
1340 *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection’, *PLoS ONE*. Edited by M. Otto.
1341 Public Library of Science, 8(2), p. e56846. doi: 10.1371/journal.pone.0056846.
- 1342 Poole, K. (2012) ‘Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative
1343 bacteria’, *Trends in Microbiology*, 20(5), pp. 227–234. doi: 10.1016/j.tim.2012.02.004.
- 1344 Proctor, R. A. *et al.* (2006) ‘Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates
1345 persistent and recurrent infections.’, *Nature reviews. Microbiology*, 4(4), pp. 295–305. doi:
1346 10.1038/nrmicro1384.
- 1347 Rahme, L. G. *et al.* (1995) ‘Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and
1348 animals.’, *Science (New York, N.Y.)*, 268(5219), pp. 1899–902. Available at:
1349 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604262> (Accessed: 11 December 2018).
- 1350 Ratjen, F. A. (2009) ‘Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies.’, *Respiratory*

- 1351 *care. Respiratory Care*, 54(5), pp. 595–605. Available at:
1352 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393104> (Accessed: 31 May 2018).
- 1353 Reuter, K., Steinbach, A. and Helms, V. (2016) ‘Interfering with Bacterial Quorum Sensing.’,
1354 *Perspectives in medicinal chemistry*, 8, pp. 1–15. doi: 10.4137/PMC.S13209.
- 1355 Roman, J. *et al.* (2004) ‘Lipopolysaccharide induces expression of fibronectin $\alpha_5\beta_1$ -integrin
1356 receptors in human monocytic cells in a protein kinase C-dependent fashion’, *American Journal*
1357 *of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1), pp. L239–L249. doi:
1358 10.1152/ajplung.00244.2003.
- 1359 Rosenbluth, D. B. *et al.* (2004) ‘Lung Function Decline in Cystic Fibrosis Patients and Timing
1360 for Lung Transplantation Referral’, *Chest*, 126(2), pp. 412–419. doi: 10.1378/chest.126.2.412.
- 1361 Sadikot, R. T. *et al.* (2005a) ‘Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa*
1362 pneumonia’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), pp. 1209–
1363 1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- 1364 Sadikot, R. T. *et al.* (2005b) ‘Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa*
1365 Pneumonia’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic
1366 Society, 171(11), pp. 1209–1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- 1367 Sampaio, A. L. F. *et al.* (2010) ‘Inflammation-dependent $\alpha_5\beta_1$ (very late antigen-5) expression
1368 on leukocytes reveals a functional role for this integrin in acute peritonitis’, *Journal of Leukocyte*
1369 *Biology*, 87(5), pp. 877–884. doi: 10.1189/jlb.1009670.
- 1370 Sawa, T. (2014) ‘The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas*
1371 *aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response.’, *Journal of intensive care*. BioMed
1372 Central, 2(1), p. 10. doi: 10.1186/2052-0492-2-10.
- 1373 Sawa, T. *et al.* (2016) ‘*Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretory Toxin ExoU and Its

- 1374 Predicted Homologs.’, *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(11).
1375 doi: 10.3390/toxins8110307.
- 1376 Sinha, B. *et al.* (1999) ‘Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via
1377 fibronectin bridging to integrin alpha5beta1.’, *Cellular microbiology*, 1(2), pp. 101–17.
1378 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207545> (Accessed: 18 February 2019).
- 1379 Sinha, B. and Fraunholz, M. (2010) ‘*Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion
1380 events’, *International Journal of Medical Microbiology*. Urban & Fischer, 300(2–3), pp. 170–
1381 175. doi: 10.1016/J.IJMM.2009.08.019.
- 1382 Sousa, A. M. and Pereira, M. O. (2014) ‘*Pseudomonas aeruginosa* Diversification during
1383 Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review.’, *Pathogens (Basel, Switzerland)*,
1384 3(3), pp. 680–703. doi: 10.3390/pathogens3030680.
- 1385 Springer, T. A. (1990) ‘Adhesion receptors of the immune system’, *Nature*, 346(6283), pp. 425–
1386 434. doi: 10.1038/346425a0.
- 1387 Sriramulu, D. D. *et al.* (2005) ‘Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas*
1388 *aeruginosa* for the cystic fibrosis lung.’, *Journal of medical microbiology*. Microbiology
1389 Society, 54(Pt 7), pp. 667–76. doi: 10.1099/jmm.0.45969-0.
- 1390 Weidenmaier, C. *et al.* (2005) ‘Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to
1391 reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of
1392 endocarditis.’, *The Journal of infectious diseases*, 191(10), pp. 1771–7. doi: 10.1086/429692.
- 1393 Westermann, A. J., Barquist, L. and Vogel, J. (2017) ‘Resolving host–pathogen interactions by
1394 dual RNA-seq’, *PLOS Pathogens*. Edited by J. B. Bliska. Public Library of Science, 13(2), p.
1395 e1006033. doi: 10.1371/journal.ppat.1006033.
- 1396 Wieland, C. W. *et al.* (2002) ‘Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa*

- 1397 lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of Interferon Regulatory Factor 1.’,
1398 *Infection and immunity*, 70(3), pp. 1352–1358. doi: 10.1128/IAI.70.3.1352.
- 1399 Williams, P. and Cámara, M. (2009) ‘Quorum sensing and environmental adaptation in
1400 *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules.’,
1401 *Current opinion in microbiology*, 12(2), pp. 182–91. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.005.
- 1402 Wolter, D. J. *et al.* (2013) ‘*Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently
1403 associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis.’, *Clinical infectious
1404 diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(3), pp. 384–
1405 91. doi: 10.1093/cid/cit270.
- 1406 Yadav, M. K. *et al.* (2017) ‘*In vitro* Multi-Species Biofilms of Methicillin-Resistant
1407 *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Host Interaction during *In vivo*
1408 Colonization of an Otitis Media Rat Model.’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*.
1409 Frontiers Media SA, 7, p. 125. doi: 10.3389/fcimb.2017.00125.
- 1410 Yue, F. *et al.* (2014) ‘A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome’,
1411 *Nature*, 515(7527), pp. 355–364. doi: 10.1038/nature13992.
- 1412

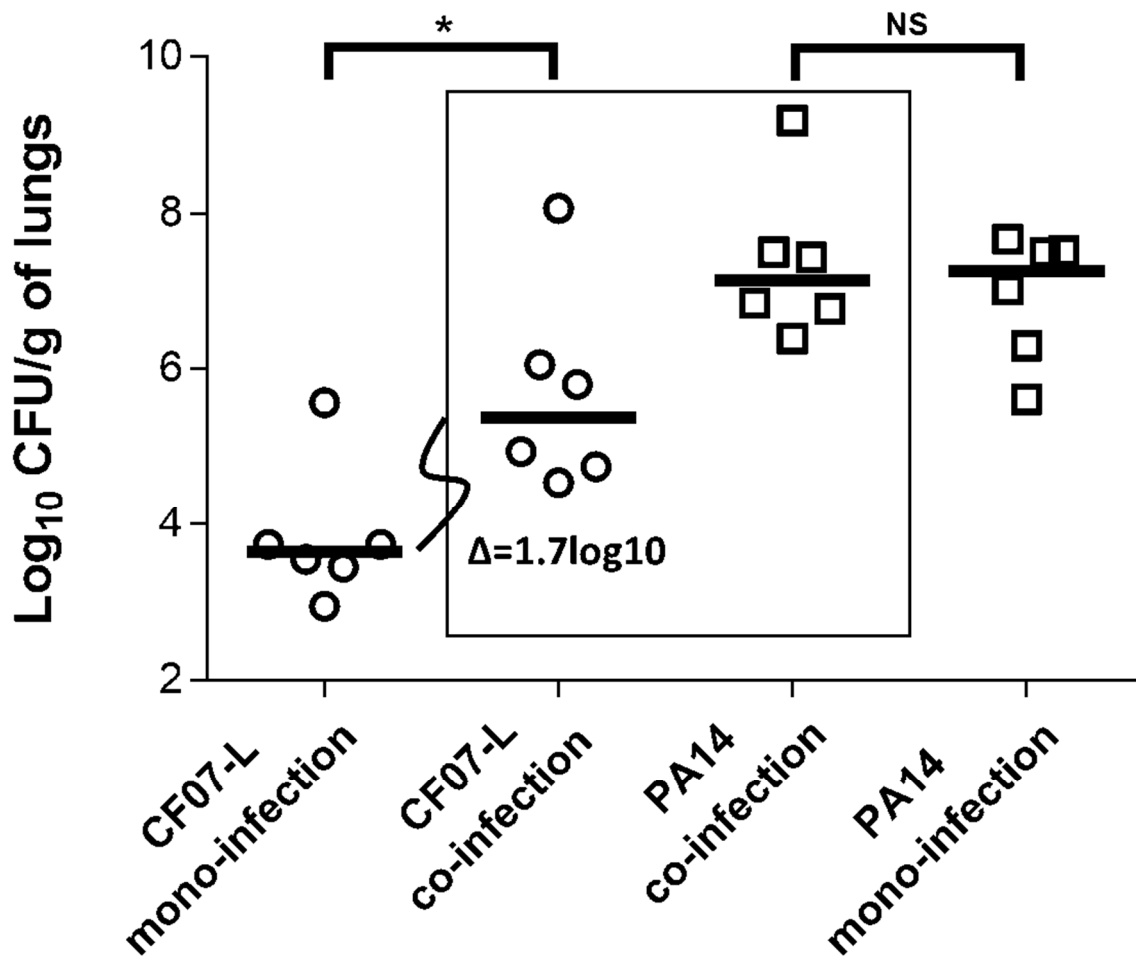
1413 2.2.8 SUPPLEMENTAL MATERIAL



1414

1415 **Figure S1. Growth kinetics and bacterial viability of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in mono**
 1416 **or co-cultures.**

1417 In A, C, and E, bacteria were grown in broth cultures and viability is expressed in log_{10} CFU/ml.
 1418 The CFU were determined by plating sample dilutions on TSA supplemented with polymyxin
 1419 B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). The solid dots (●) and full red lines represent
 1420 counts in *P. aeruginosa* mono-cultures; the open dots (○) and dashed red lines, *P. aeruginosa*
 1421 counts in co-cultures; the solid triangles (▼) and full blue lines, counts of *S. aureus* in mono-
 1422 cultures; the open triangles (▽) and dashed blue lines, *S. aureus* counts in co-cultures. In B, D
 1423 and F, the Petri assay was realized by plating *S. aureus* on TSA and applying a spot of *P.*
 1424 *aeruginosa* in the centre of the plate. The plates were photographed after 24h of incubation. The
 1425 *P. aeruginosa* and *S. aureus* pairs tested were PA6B and CF6B-L (in A and B), PAC39A and
 1426 CF39A-L (in C and D), and PAC112A and CF112A-L (in E and F), respectively.

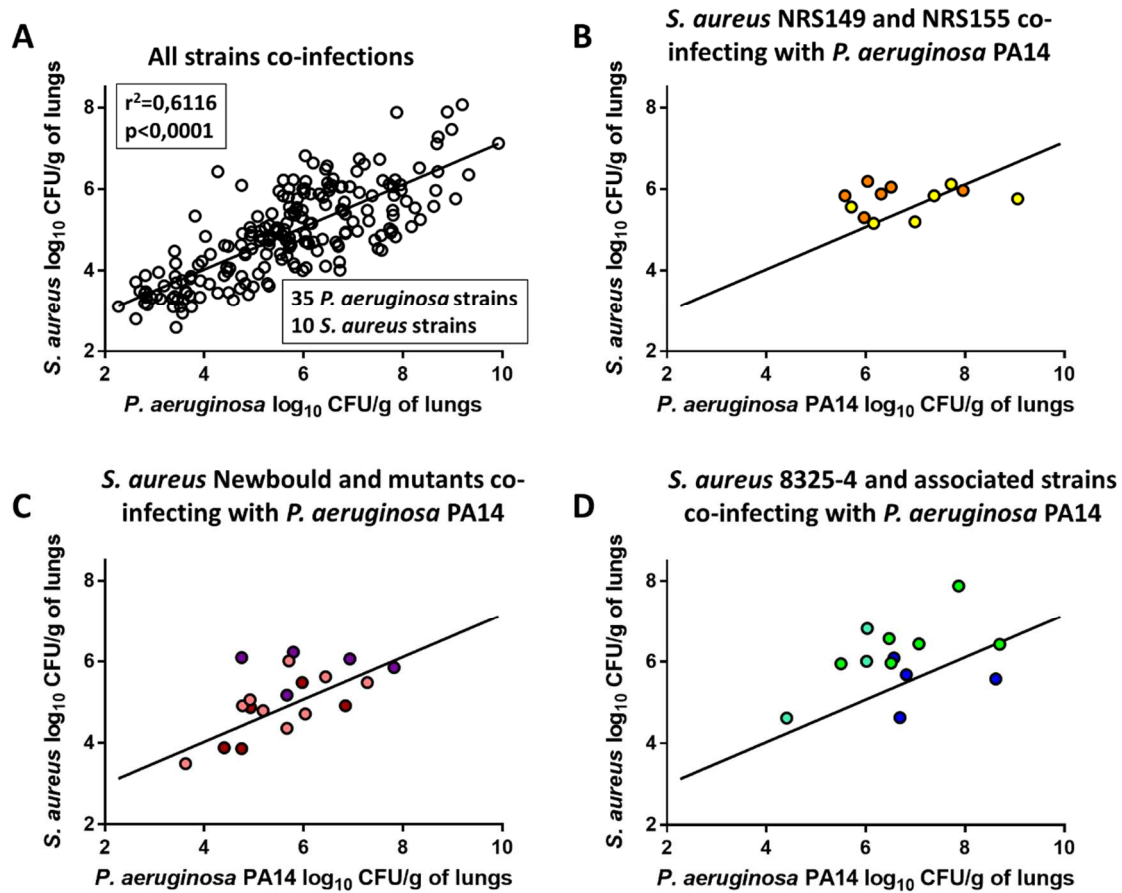


1427

1428 **Figure S2. Mouse pulmonary mono or co-infections with *S. aureus* and *P. aeruginosa*.**

1429 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
 1430 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). CFUs retrieved from co-
 1431 infections are indicated by boxes. For co-infections, the starting inoculum was equivalent to the
 1432 sum of each inoculum used in mono-infections. The pairs tested were *P. aeruginosa* PAC14 and
 1433 *S. aureus* CF07-L. The median for each group is indicated by the horizontal bar. Statistical
 1434 differences between the median log₁₀ CFU per gram of lungs for mono and co-infections for
 1435 both *P. aeruginosa* and *S. aureus* were determined with a Mann-Whitney test : NS, not
 1436 statistically significant, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$.

1437



1438

1439 **Figure S3. Compilation of mixed mouse pulmonary infections with *S. aureus* and *P.***
 1440 ***aeruginosa*.**

1441 CFUs were determined 24 h post-infection by plating lungs homogenates on TSA supplemented
 1442 with polymyxin B (*S. aureus*) or with rifampicin (*P. aeruginosa*). For co-infections, the starting
 1443 inoculum was equivalent to the sum of each inoculum used in mono-infections. The strains
 1444 tested were *S. aureus* CF07-L, CF54A-L, CF112A-L and every *S. aureus* strains indicated in
 1445 **T1** co-infecting with *P. aeruginosa* PA14, PAC54A, PAC112A, all PA14 mutants indicated in
 1446 **T1** and 29 clinical isolates (A); NRS149 and NRS155 co-infecting with PA14, at an inoculum
 1447 of 2×10^6 CFU (B); Newbould, Newbould $\Delta sigB$ and Newbould $\Delta hemB$ co-infecting with PA14,
 1448 at an inoculum of 2×10^6 CFU (C); SH1000, 8325-4 and 8325-4 $\Delta fnbAB$ co-infecting with
 1449 PA14, at an inoculum of 2×10^6 CFU (D). Statistical significance of the trendline of all strains
 1450 co-infections was determined with a linear regression test. Yellow dots represent NRS149 co-

1451 infections; orange dots represent NRS155 co-infections; red dots represent Newbould co-
1452 infections; purple dots represent Newbould $\Delta sigB$ co-infections; pink dots represent
1453 Newbould $\Delta hemB$ co-infections; green dots represent SH1000 co-infections; teal dots represent
1454 8325-4 co-infections; blue dots represent 8325-4 $\Delta\Delta fnbAB$.

1455

CHAPITRE 3

1456

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

1457 3.1 RAPPEL DES RÉSULTATS

1458 L'objectif de mes travaux de maîtrise était de démontrer que la coexistence prolongée de
1459 souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* mène à des changements physiologiques et/ou
1460 génétiques, pouvant moduler leur virulence et coexistence *in vivo*. Comme les souches
1461 provenant d'infections mixtes persistantes dans le temps démontrent un antagonisme absent ou
1462 réduit *in vitro* (Fugère *et al.*, 2014; Limoli *et al.*, 2017), nous avons émis l'hypothèse que ces
1463 mêmes co-isolats pourraient également coexister *in vivo*; comme les souches ne provenant pas
1464 d'infections mixtes (i.e. les souches prototypes) sont normalement antagonistes *in vitro*, nous
1465 supposons aussi que la coexistence *in vivo* de ces souches serait altérée comparativement à celle
1466 des co-isolats cliniques.

1467 À l'aide de deux modèles de co-culture *in vitro*, l'interaction différente des co-isolats à celles
1468 des souches prototypiques a été vérifiée et confirmée. Ainsi, les paires co-isolées ne
1469 démontraient pas toutes de l'antagonisme; dans 2 des 6 paires, *P. aeruginosa* ne montrait aucun
1470 antagonisme envers *S. aureus*, alors que les autres variaient d'un impact modéré à fort, allant
1471 jusqu'à un niveau équivalent à celui des souches prototypiques. Cette réduction de
1472 l'antagonisme pourrait être attribuée au fait que lors d'infections chroniques, *P. aeruginosa* a
1473 tendance à diminuer sa virulence afin d'entraîner une réponse immunitaire moins forte
1474 (MacDougall *et al.*, 2005; Poole, 2012; Gellatly and Hancock, 2013). Ainsi, ces facteurs de
1475 virulence antagonisant normalement *S. aureus* ne sont plus autant exprimés. À priori, la
1476 coexistence entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* *in vivo* pourrait n'être que due à la réduction de la
1477 virulence de *P. aeruginosa*, comme il a été suggéré précédemment (Limoli *et al.*, 2017).

1478 À notre connaissance, très peu d'études scientifiques ont décrit l'interaction de co-isolats *P.*
1479 *aeruginosa* – *S. aureus* dans des modèles d'infection *in vivo*. Comme les co-isolats ne
1480 s'antagonisent plus autant que les souches prototypes *in vitro*, nous nous attendions à ce que les
1481 co-isolats ne démontrent aucune réduction de colonisation, tandis que dans le cas des souches
1482 prototypiques, *S. aureus* atteindrait des niveaux de colonisation moins élevés. Or, au contraire,
1483 autant les souches de *P. aeruginosa* co-isolées que celles prototypiques favorisaient la
1484 colonisation de *S. aureus*; et même, les souches prototypiques antagonistes *in vitro* aidaient
1485 davantage *S. aureus* que les souches co-isolées non-antagonistes. Ce résultat inattendu pourrait
1486 s'expliquer par le fait que les souches antagonistes testées atteignaient de plus hauts niveaux de
1487 colonisation que les isolats non-antagonistes. Ainsi, en compilant tous les résultats d'infections
1488 mixtes, il a été déterminé qu'une corrélation directe existait entre le pouvoir de colonisation de
1489 *P. aeruginosa* et l'augmentation de la colonisation de *S. aureus*. Ainsi, l'interaction *in vitro* se
1490 révèle être un mauvais indicateur de la vraie nature de l'interaction *in vivo* de *P. aeruginosa* et
1491 de *S. aureus*; la survie augmentée de *S. aureus* ne dépendrait donc pas de l'absence
1492 d'antagonisme *in vitro*, mais plutôt de la capacité de *P. aeruginosa* à infecter adéquatement les
1493 poumons.

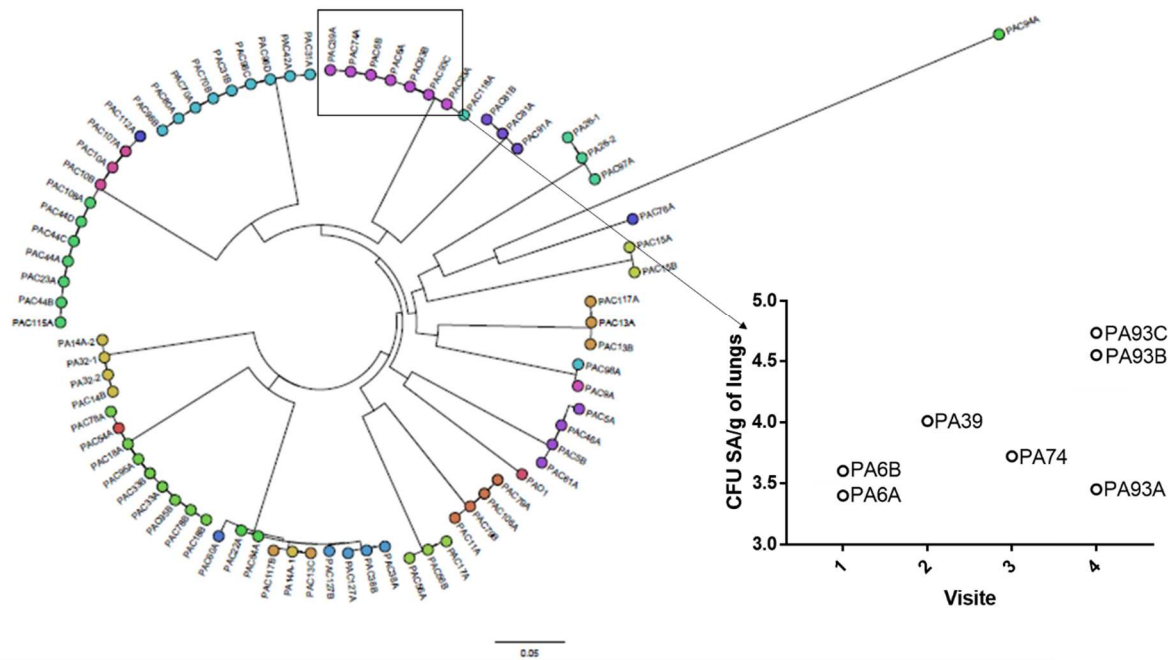
1494 Alors qu'aucun facteur de virulence spécifique à *P. aeruginosa* n'a pu être identifié à lui seul
1495 comme étant responsable de l'accroissement de la colonisation de *S. aureus*, et que les deux
1496 principaux facteurs de transcription de la virulence de *S. aureus* ne semblaient pas avoir
1497 d'impact dans ce phénomène, l'impact de *P. aeruginosa* sur l'hôte semblerait être le mécanisme
1498 responsable de la survie accrue de *S. aureus*. En effet, les récepteurs ICAM-1 et ITGA-5 qui
1499 sont répertoriés comme favorisant l'internalisation cellulaire de *S. aureus* (Passariello *et al.*,
1500 2006; Kim *et al.*, 2015), donc favorisant possiblement sa survie et persistance face au système
1501 immunitaire, sont surexprimés en présence de *P. aeruginosa*.

1502 **3.2 PERSPECTIVES**

1503 Comme il a été démontré qu'il y a une corrélation directe entre la colonisation du poumon de *P.*
1504 *aeruginosa* et sa capacité à induire la colonisation de *S. aureus*, il est plausible de croire que

1505 certains facteurs de virulence permettront à *P. aeruginosa* de mieux coloniser et du fait même,
1506 permettre à *S. aureus* d'infecter davantage. En effet, même si aucun facteur de virulence n'a été
1507 identifié comme étant individuellement responsable pour la coopération de *P. aeruginosa* envers
1508 *S. aureus in vivo*, il n'en demeure pas moins que certains facteurs de virulence pourraient
1509 favoriser et améliorer davantage la colonisation de *P. aeruginosa* dans le poumon. Notamment,
1510 les différents mutants de *P. aeruginosa* dans leur virulence étaient moins efficaces dans leur
1511 capacité d'infection que la souche parente, et les isolats cliniques n'infectaient pas tous aussi
1512 bien les poumons des souris. Ainsi, il serait bon de vérifier si les souches atteignant les plus
1513 hauts niveaux d'infections présentent des particularités génétiques différentes des isolats
1514 colonisant le moins.

1515 Les différents isolats cliniques lors de mes études de maîtrise proviennent d'une étude
1516 précédente (Fugère *et al.*, 2014), où 63 isolats de *P. aeruginosa* ont été prélevés des voies
1517 respiratoires de 32 patients atteints de la FK au cours d'une étude de 3 ans. De ces 63 isolats, 23
1518 ont été co-isolés avec *S. aureus*. Or, plusieurs isolats de *P. aeruginosa* ont été recueillis chez un
1519 même patient au cours de plusieurs visites. S'il s'avérait que ces isolats soient en réalité une
1520 lignée de clones, c'est-à-dire qu'il s'agisse de la même souche ayant persisté à travers le temps
1521 pour toutes ces visites, il serait également possible de comparer tous ces isolats entre eux. À
1522 l'aide du logiciel Harvest, l'équipe de notre collaborateur, le Pr. Roger Lévesque, a établi un
1523 arbre phylogénétique à partir de 123,576 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) et est parvenue
1524 à distinguer des lignées de clones séquentiels (**Figure 1**). Dans cette figure, les souches sont
1525 colorées par patient et les souches les plus génétiquement semblables sont les plus près dans
1526 l'arbre. On voit ainsi que plusieurs isolats provenant d'un même patient sont groupés; il sera
1527 donc possible de déterminer si des mutations survenant au fil du temps dans ces clones sont
1528 associées au potentiel inducteur de colonisation de *S. aureus*. En guise de résultat préliminaire,
1529 un exemple de clones séquentiels avec la colonisation induite de *S. aureus* a été ajouté. On
1530 observe notamment que les premiers isolats de la série induisent peu *S. aureus* (environ 3.5 log)
1531 alors que les isolats recueillis lors de la dernière visite sont beaucoup plus aptes à faciliter la
1532 colonisation de *S. aureus* (plus de 4.5 log).



1533

1534 **Figure 8. Arbre phylogénétique des isolats cliniques et colonisation de *S. aureus* en fonction**
 1535 **de différents clones séquentiels de *P. aeruginosa***

1536 Afin de compléter les observations démontrant la surexpression des récepteurs ICAM-1 et
 1537 ITGA-5, il serait adéquat d'utiliser un modèle de culture cellulaire. En effet, en plus d'arriver à
 1538 quantifier les transcrits pour ces deux protéines chez les cellules en culture, il serait possible de
 1539 vérifier l'internalisation cellulaire de *S. aureus*; en retirant le surnageant et en ne conservant que
 1540 les cellules, ces dernières pourraient être lysées afin de faire un dénombrement bactérien de ce
 1541 qui se trouve à l'intérieur. Il s'agirait donc d'une preuve de concept, c'est-à-dire prouver que la
 1542 surexpression de ces récepteurs engendre effectivement davantage d'internalisation de *S. aureus*
 1543 à l'intérieur des cellules.

1544 Il semble évident que *P. aeruginosa*, lors de ses infections, parviennent à modifier l'expression
 1545 de transcrits des cellules de l'hôte autre que ICAM-1 et ITGA-5. Ainsi, *P. aeruginosa* pourrait
 1546 altérer d'autres mécanismes cellulaires qui, à leur tour, pourraient aussi avoir un impact sur
 1547 l'effet coopératif observé de *P. aeruginosa* envers *S. aureus*. Afin de vérifier cette hypothèse,
 1548 un RNAseq double pourrait être réalisé sur des tissus pulmonaires infectés de souris, afin de

1549 quantifier le transcriptome des pathogènes infectieux et le transcriptome des cellules faisant face
1550 à ce stress (Westermann, Barquist and Vogel, 2017).

1551 3.3 CONCLUSION

1552 En conclusion, nous avons démontré que même si l'interaction *in vitro* d'isolats de *S. aureus* et
1553 de *P. aeruginosa* est antagoniste ou non, *P. aeruginosa* améliore la colonisation de *S. aureus*
1554 proportionnellement à son propre pouvoir infectieux. Ce mécanisme pourrait impliquer
1555 l'induction de ICAM-1 et ITGA-5, qui favoriserait possiblement l'adhésion et l'internalisation
1556 cellulaire de *S. aureus*. Ainsi, nous avons prouvé que *S. aureus* demeure un pathogène prévalent
1557 même en présence de *P. aeruginosa*, malgré des informations *in vitro* à priori contradictoires. Il
1558 a déjà été établi qu'une première infection à *S. aureus* dans un modèle pulmonaire murin
1559 entraîne la formation d'abcès, ce qui favorise la colonisation subséquente de *P. aeruginosa*
1560 (Cigana *et al.*, 2018). Ainsi, cette expérience visait à reproduire l'ordre d'apparition
1561 chronologique de ces deux pathogènes qui est typiquement observé chez les patients atteints de
1562 la FK. Or, dans le cadre de l'étude traitée dans ce mémoire, on observe que *P. aeruginosa*
1563 améliore également la colonisation de *S. aureus* lors d'infections pulmonaires chez la souris. À
1564 la vue de ces résultats, il est plausible de croire que le mutualisme entre ces deux pathogènes va
1565 au-delà de la pré-infection à *S. aureus* améliorant la colonisation de *P. aeruginosa*; ce dernier
1566 contribuerait aussi au maintien des infections à *S. aureus*. Comme les infections mixtes sont
1567 plus nuisibles que les infections simples, les traitements antibiotiques utilisés en FK pourraient
1568 être adaptés afin de traiter également *S. aureus*, et non pas seulement *P. aeruginosa* comme il
1569 est actuellement la norme.

1570

1571

BIBLIOGRAPHIE

1572 Ahuja, N., Kumar, P. and Bhatnagar, R. (2004) 'The Adenylate Cyclase Toxins', *Critical*
1573 *Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis, 30(3), pp. 187–196. doi:
1574 10.1080/10408410490468795.

1575 Archer, N. K. *et al.* (2011) 'Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in
1576 human disease.', *Virulence*, 2(5), pp. 445–59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.

1577 Boulanger, S. *et al.* (2015) 'Bactericidal Effect of Tomatidine-Tobramycin Combination against
1578 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced by
1579 Interspecific Small-Molecule Interactions.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12),
1580 pp. 7458–64. doi: 10.1128/AAC.01711-15.

1581 Boyd, A. and Chakrabarty, A. M. (1995) '*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the
1582 alginate exopolysaccharide', *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), pp. 162–168. doi:
1583 10.1007/BF01569821.

1584 Carnoy, C. *et al.* (1993) 'Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients
1585 with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*.', *American journal of*
1586 *respiratory cell and molecular biology*, 9(3), pp. 323–34. doi: 10.1165/ajrcmb/9.3.323.

1587 Carnoy, C. *et al.* (1994) '*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human
1588 respiratory mucus glycoproteins.', *Infection and immunity*, 62(5), pp. 1896–900. Available at:
1589 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168955> (Accessed: 23 October 2016).

1590 Cigana, C. *et al.* (2018) '*Staphylococcus aureus* Impacts *Pseudomonas aeruginosa* Chronic
1591 Respiratory Disease in Murine Models', *Journal of Infectious Diseases*, 217(6), pp. 933–942.
1592 doi: 10.1093/infdis/jix621.

- 1593 CLSI (2018) ‘Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for
1594 antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document
1595 M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA’.
- 1596 Côté-Gravel, J. *et al.* (2016) ‘Characterization of a *vraG* Mutant in a Genetically Stable
1597 *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant and Preliminary Assessment for Use as a Live-
1598 Attenuated Vaccine against Intramammary Infections Characterization of a *vraG* Mutant in a
1599 Genetically Stable’. doi: 10.1371/journal.pone.0166621.
- 1600 Cystic Fibrosis Canada, C. F. (2018) *The Canadian Cystic Fibrosis Registry Annual Report*.
1601 Available at: www.cysticfibrosis.ca. (Accessed: 11 December 2018).
- 1602 Dekimpe, V. and Déziel, E. (2009) ‘Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas*
1603 *aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors.’, *Microbiology*
1604 (*Reading, England*), 155(Pt 3), pp. 712–23. doi: 10.1099/mic.0.022764-0.
- 1605 Déziel, E. *et al.* (2004) ‘Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines
1606 (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication.’,
1607 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.
1608 1339–44. doi: 10.1073/pnas.0307694100.
- 1609 Fagerberg, L. *et al.* (2014) ‘Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide
1610 Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics’, *Molecular & Cellular*
1611 *Proteomics*, 13(2), pp. 397–406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- 1612 Folkesson, A. *et al.* (2012) ‘Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis
1613 airway: an evolutionary perspective’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group,
1614 10(12), pp. 841–51. doi: 10.1038/nrmicro2907.
- 1615 Fugère, A. *et al.* (2014) ‘Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of

- 1616 *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients.’, *PloS*
1617 *one*. Public Library of Science, 9(1), p. e86705. doi: 10.1371/journal.pone.0086705.
- 1618 Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994) ‘Quorum sensing in bacteria: the
1619 LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.’, *Journal of*
1620 *bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 176(2), pp. 269–75. Available at:
1621 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288518> (Accessed: 25 December 2018).
- 1622 Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. W. (2013) ‘*Pseudomonas aeruginosa*: new insights into
1623 pathogenesis and host defenses’, *Pathogens and Disease*. Oxford University Press, 67(3), pp.
1624 159–173. doi: 10.1111/2049-632X.12033.
- 1625 Goerke, C. and Wolz, C. (2010) ‘Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis
1626 lung.’, *International journal of medical microbiology: IJMM*, 300(8), pp. 520–5. doi:
1627 10.1016/j.ijmm.2010.08.003.
- 1628 Gómez, M. I. and Prince, A. (2007) ‘Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas*
1629 infections in cystic fibrosis.’, *Current opinion in pharmacology*, 7(3), pp. 244–51. doi:
1630 10.1016/j.coph.2006.12.005.
- 1631 Harun, S. N. *et al.* (2016) ‘A systematic review of studies examining the rate of lung function
1632 decline in patients with cystic fibrosis’, *Paediatric Respiratory Reviews*, 20, pp. 55–66. doi:
1633 10.1016/j.prrv.2016.03.002.
- 1634 Hoffman, L. R. *et al.* (2006) ‘Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to
1635 growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*.’, *Proceedings of the National Academy of*
1636 *Sciences of the United States of America*, 103(52), pp. 19890–5. doi: 10.1073/pnas.0606756104.
- 1637 Hotterbeekx, A. *et al.* (2017) ‘*In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas*
1638 *aeruginosa* and *Staphylococcus* spp.’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*.

- 1639 Frontiers Media SA, 7, p. 106. doi: 10.3389/fcimb.2017.00106.
- 1640 Hubert, D. *et al.* (2013) ‘Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with
1641 *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis’, *Journal of*
1642 *Cystic Fibrosis*. Elsevier, 12(5), pp. 497–503. doi: 10.1016/j.jcf.2012.12.003.
- 1643 Ji, G., Beavis, R. and Novick, R. P. (1997) ‘Bacterial interference caused by autoinducing
1644 peptide variants.’, *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), pp. 2027–30. Available at:
1645 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197262> (Accessed: 11 December 2018).
- 1646 Josse, J., Laurent, F. and Diot, A. (2017) ‘Staphylococcal adhesion and host cell invasion:
1647 Fibronectin-binding and other mechanisms’, *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–8. doi:
1648 10.3389/fmicb.2017.02433.
- 1649 Junge, S. *et al.* (2016) ‘Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients
1650 with Persistent *Staphylococcus aureus*’, *PLOS ONE*. Edited by A. Omri. Public Library of
1651 Science, 11(11), p. e0166220. doi: 10.1371/journal.pone.0166220.
- 1652 Kahl, B. C., Becker, K. and Löffler, B. (2016) ‘Clinical Significance and Pathogenesis of
1653 Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections.’, *Clinical microbiology reviews*.
1654 American Society for Microbiology, 29(2), pp. 401–27. doi: 10.1128/CMR.00069-15.
- 1655 Kim, T.-K. *et al.* (2015) ‘A systems approach to understanding human rhinovirus and influenza
1656 virus infection’, *Virology*. Academic Press, 486, pp. 146–157. doi:
1657 10.1016/J.VIROL.2015.08.014.
- 1658 Kreda, S. M., Davis, C. W. and Rose, M. C. (2012) ‘CFTR, mucins, and mucus obstruction in
1659 cystic fibrosis.’, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory
1660 Press, 2(9), p. a009589. doi: 10.1101/cshperspect.a009589.
- 1661 Lamont, I. L. *et al.* (2002) ‘Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor

- 1662 production in *Pseudomonas aeruginosa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
1663 99(10), pp. 7072–7077. doi: 10.1073/pnas.092016999.
- 1664 Liberati, N. T. *et al.* (2006) *An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa*
1665 *strain PA14 transposon insertion mutants*. Available at:
1666 www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0511100103 (Accessed: 11 December 2018).
- 1667 Lightbown, J. W. and Jackson, F. L. (1956) 'Inhibition of cytochrome systems of heart muscle
1668 and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-
1669 oxides.', *The Biochemical journal*, 63(1), pp. 130–7. Available at:
1670 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13315258> (Accessed: 25 July 2017).
- 1671 Limoli, D. H. *et al.* (2016) '*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection
1672 is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes', *European Journal*
1673 *of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, 35(6), pp. 947–
1674 953. doi: 10.1007/s10096-016-2621-0.
- 1675 Limoli, D. H. *et al.* (2017) '*Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes
1676 Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection.',
1677 *mBio*. American Society for Microbiology (ASM), 8(2). doi: 10.1128/mBio.00186-17.
- 1678 Lin, C. K. and Kazmierczak, B. I. (2017) 'Inflammation: A Double-Edged Sword in the
1679 Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection.', *Journal of innate immunity*, 9(3), pp. 250–
1680 261. doi: 10.1159/000455857.
- 1681 Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. (2002) 'Lung Infections Associated with Cystic
1682 Fibrosis', *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 194–222. doi: 10.1128/CMR.15.2.194-
1683 222.2002.
- 1684 Lyon, G. J. *et al.* (2000) 'Rational design of a global inhibitor of the virulence response in

1685 *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-
1686 histidine kinase, AgrC.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*
1687 *of America*. National Academy of Sciences, 97(24), pp. 13330–5. doi:
1688 10.1073/pnas.97.24.13330.

1689 MacDougall, C. *et al.* (2005) ‘*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and
1690 Fluoroquinolone Use’, *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), pp. 1197–1210. doi:
1691 10.3201/eid1108.050116.

1692 Machan, Z. A. *et al.* (1992) ‘2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent
1693 produced by *Pseudomonas aeruginosa*.’, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 30(5), pp.
1694 615–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1493979> (Accessed: 25 July 2017).

1695 Marshall, B. C. and Carroll, K. C. (1991) ‘Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and
1696 host defenses in cystic fibrosis.’, *Seminars in respiratory infections*, 6(1), pp. 11–8. Available
1697 at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909452> (Accessed: 23 October 2016).

1698 Merino, N. *et al.* (2009) ‘Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*’,
1699 *Journal of Bacteriology*, 191(3), pp. 832–843. doi: 10.1128/JB.01222-08.

1700 Mitchell, G. *et al.* (2008) ‘*Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-
1701 bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants
1702 isolated from cystic fibrosis patients’, *Molecular Microbiology*, 70(6), pp. 1540–1555. doi:
1703 10.1111/j.1365-2958.2008.06511.x.

1704 Mitchell, G. *et al.* (2010) ‘*Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-
1705 colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-
1706 hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide.’, *BMC microbiology*, 10, p. 33. doi: 10.1186/1471-2180-
1707 10-33.

- 1708 Mitchell, G., Grondin, G., *et al.* (2011) 'Infection of polarized airway epithelial cells by normal
1709 and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal
1710 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF- κ B',
1711 *Infection and Immunity*, 79(9), pp. 3541–3551. doi: 10.1128/IAI.00078-11.
- 1712 Mitchell, G., Gattuso, M., *et al.* (2011) 'Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus*
1713 *aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells.', *Antimicrobial agents*
1714 *and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 55(5), pp. 1937–45. doi:
1715 10.1128/AAC.01468-10.
- 1716 Mitchell, G. *et al.* (2012) 'Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against
1717 multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression', *Journal of*
1718 *Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), pp. 559–568. doi: 10.1093/jac/dkr510.
- 1719 Mitchell, G. *et al.* (2013a) 'SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus*
1720 *aureus* Small-Colony Variants', *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0065018.
- 1721 Mitchell, G. *et al.* (2013b) 'SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus*
1722 *aureus* Small-Colony Variants', *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0065018.
- 1723 Moisan, H. *et al.* (2006a) 'Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-
1724 colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB.', *Journal of*
1725 *bacteriology*, 188(1), pp. 64–76. doi: 10.1128/JB.188.1.64-76.2006.
- 1726 Moisan, H. *et al.* (2006b) 'Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-
1727 colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB', *Journal of*
1728 *Bacteriology*, 188(1), pp. 64–76. doi: 10.1128/JB.188.1.64-76.2006.
- 1729 Novick, R. P. (2003) 'Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal
1730 virulence', *Molecular Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 48(6), pp. 1429–1449. doi:

- 1731 10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.
- 1732 Novick, R. P. and Geisinger, E. (2008) ‘Quorum Sensing in Staphylococci’, *Annual Review of*
1733 *Genetics*. Annual Reviews , 42(1), pp. 541–564. doi:
1734 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- 1735 O’Neill, A. J. (2010) ‘*Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: comparative genome
1736 sequences of key laboratory strains in staphylococcal research’, *Letters in Applied*
1737 *Microbiology*, 51(3), pp. 358–361. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02885.x.
- 1738 Otto, M., Steele-Mortimer, O. and Subtil, A. (2014) ‘*Staphylococcus aureus* toxins’, *Current*
1739 *Opinion in Microbiology*, 17, pp. 32–37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- 1740 Palmer, K. L. *et al.* (2005) ‘Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of
1741 *Pseudomonas aeruginosa* physiology.’, *Journal of bacteriology*, 187(15), pp. 5267–77. doi:
1742 10.1128/JB.187.15.5267-5277.2005.
- 1743 Parkins, M. D., Rendall, J. C. and Elborn, J. S. (2012) ‘Incidence and Risk Factors for
1744 Pulmonary Exacerbation Treatment Failures in Patients With Cystic Fibrosis Chronically
1745 Infected With *Pseudomonas aeruginosa*’, *Chest*, 141(2), pp. 485–493. doi: 10.1378/chest.11-
1746 0917.
- 1747 Passariello, C. *et al.* (2006) ‘Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus*
1748 into non-fully permissive cultured pneumocytes’, *Microbes and Infection*, 8(3), pp. 758–766.
1749 doi: 10.1016/j.micinf.2005.09.013.
- 1750 Pastar, I. *et al.* (2013) ‘Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and
1751 *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection’, *PLoS ONE*. Edited by M. Otto.
1752 Public Library of Science, 8(2), p. e56846. doi: 10.1371/journal.pone.0056846.
- 1753 Poole, K. (2012) ‘Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative

- 1754 bacteria', *Trends in Microbiology*, 20(5), pp. 227–234. doi: 10.1016/j.tim.2012.02.004.
- 1755 Proctor, R. A. *et al.* (2006) 'Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates
1756 persistent and recurrent infections.', *Nature reviews. Microbiology*, 4(4), pp. 295–305. doi:
1757 10.1038/nrmicro1384.
- 1758 Rahme, L. G. *et al.* (1995) 'Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and
1759 animals.', *Science (New York, N.Y.)*, 268(5219), pp. 1899–902. Available at:
1760 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604262> (Accessed: 11 December 2018).
- 1761 Ratjen, F. A. (2009) 'Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies.', *Respiratory*
1762 *care. Respiratory Care*, 54(5), pp. 595–605. Available at:
1763 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393104> (Accessed: 31 May 2018).
- 1764 Reuter, K., Steinbach, A. and Helms, V. (2016) 'Interfering with Bacterial Quorum Sensing.',
1765 *Perspectives in medicinal chemistry*, 8, pp. 1–15. doi: 10.4137/PMC.S13209.
- 1766 Roman, J. *et al.* (2004) 'Lipopolysaccharide induces expression of fibronectin $\alpha_5\beta_1$ -integrin
1767 receptors in human monocytic cells in a protein kinase C-dependent fashion', *American Journal*
1768 *of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1), pp. L239–L249. doi:
1769 10.1152/ajplung.00244.2003.
- 1770 Rosenbluth, D. B. *et al.* (2004) 'Lung Function Decline in Cystic Fibrosis Patients and Timing
1771 for Lung Transplantation Referral', *Chest*, 126(2), pp. 412–419. doi: 10.1378/chest.126.2.412.
- 1772 Sadikot, R. T. *et al.* (2005a) 'Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa*
1773 pneumonia', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), pp. 1209–
1774 1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- 1775 Sadikot, R. T. *et al.* (2005b) 'Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa*
1776 Pneumonia', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic

- 1777 Society, 171(11), pp. 1209–1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- 1778 Sampaio, A. L. F. *et al.* (2010) ‘Inflammation-dependent $\alpha 5\beta 1$ (very late antigen-5) expression
1779 on leukocytes reveals a functional role for this integrin in acute peritonitis’, *Journal of Leukocyte*
1780 *Biology*, 87(5), pp. 877–884. doi: 10.1189/jlb.1009670.
- 1781 Sawa, T. (2014) ‘The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas*
1782 *aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response.’, *Journal of intensive care*. BioMed
1783 Central, 2(1), p. 10. doi: 10.1186/2052-0492-2-10.
- 1784 Sawa, T. *et al.* (2016) ‘*Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretory Toxin ExoU and Its
1785 Predicted Homologs.’, *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(11).
1786 doi: 10.3390/toxins8110307.
- 1787 Sinha, B. *et al.* (1999) ‘Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via
1788 fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$.’, *Cellular microbiology*, 1(2), pp. 101–17.
1789 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207545> (Accessed: 18 February 2019).
- 1790 Sinha, B. and Fraunholz, M. (2010) ‘*Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion
1791 events’, *International Journal of Medical Microbiology*. Urban & Fischer, 300(2–3), pp. 170–
1792 175. doi: 10.1016/J.IJMM.2009.08.019.
- 1793 Sousa, A. M. and Pereira, M. O. (2014) ‘*Pseudomonas aeruginosa* Diversification during
1794 Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review.’, *Pathogens (Basel, Switzerland)*,
1795 3(3), pp. 680–703. doi: 10.3390/pathogens3030680.
- 1796 Springer, T. A. (1990) ‘Adhesion receptors of the immune system’, *Nature*, 346(6283), pp. 425–
1797 434. doi: 10.1038/346425a0.
- 1798 Sriramulu, D. D. *et al.* (2005) ‘Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas*
1799 *aeruginosa* for the cystic fibrosis lung.’, *Journal of medical microbiology*. Microbiology

- 1800 Society, 54(Pt 7), pp. 667–76. doi: 10.1099/jmm.0.45969-0.
- 1801 Weidenmaier, C. *et al.* (2005) ‘Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to
1802 reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of
1803 endocarditis.’, *The Journal of infectious diseases*, 191(10), pp. 1771–7. doi: 10.1086/429692.
- 1804 Westermann, A. J., Barquist, L. and Vogel, J. (2017) ‘Resolving host–pathogen interactions by
1805 dual RNA-seq’, *PLOS Pathogens*. Edited by J. B. Bliska. Public Library of Science, 13(2), p.
1806 e1006033. doi: 10.1371/journal.ppat.1006033.
- 1807 Wieland, C. W. *et al.* (2002) ‘Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa*
1808 lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of Interferon Regulatory Factor 1.’,
1809 *Infection and immunity*, 70(3), pp. 1352–1358. doi: 10.1128/IAI.70.3.1352.
- 1810 Williams, P. and Cámara, M. (2009) ‘Quorum sensing and environmental adaptation in
1811 *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules.’,
1812 *Current opinion in microbiology*, 12(2), pp. 182–91. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.005.
- 1813 Wolter, D. J. *et al.* (2013) ‘*Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently
1814 associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis.’, *Clinical infectious
1815 diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(3), pp. 384–
1816 91. doi: 10.1093/cid/cit270.
- 1817 Yadav, M. K. *et al.* (2017) ‘*In vitro* Multi-Species Biofilms of Methicillin-Resistant
1818 *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Host Interaction during *In vivo*
1819 Colonization of an Otitis Media Rat Model.’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*.
1820 Frontiers Media SA, 7, p. 125. doi: 10.3389/fcimb.2017.00125.
- 1821 Yue, F. *et al.* (2014) ‘A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome’,
1822 *Nature*, 515(7527), pp. 355–364. doi: 10.1038/nature13992.

