

ANDRÉE-ANN LEMIEUX

**GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE DES GÈNES
UNIQUES CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA
LESB58 ET ESSENTIELS À L'INFECTION
PULMONAIRE CHRONIQUE**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT D'IMMUNOLOGIE, D'INFECTIOLOGIE ET DE MICROBIOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique (FK). L'émergence de nouvelles souches épidémiques hypervirulentes, multi-résistantes aux antibiotiques et possédant une grande capacité de transmission, telles que LESB58, entraîne de grandes difficultés de traitement et une augmentation de la mortalité chez ces patients. Le séquençage complet de LESB58 a révélé un génome à 90% hautement conservé additionné de 455 gènes regroupés sous six prophages (PPs) et cinq îlots génomiques (GIs). Cette étude a pour objectif de déterminer l'implication de ces régions supplémentaires dans la pathogénie de LESB58. Une mutagenèse à étiquette signature (STM) suivie de plusieurs criblages ont permis de sélectionner 162 mutants dont 11 portant une insertion dans un GI ou PP. Des analyses subséquentes ont été réalisées sur ces mutants afin d'évaluer leur niveau de virulence *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. Des analyses de génomique ont été effectuées sur deux de ces mutants afin de mieux comprendre leur incapacité à établir l'infection dans le modèle d'infection *in vivo*.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen and causes chronic pulmonary infection to cystic fibrosis (CF) patients. The hypervirulent epidemic strain LESB58 is associated with high transmissibility and is highly resistant to antibiotics causing increased morbidity and mortality. Whole genome sequencing of LESB58 revealed a 90% highly conserved core genome and 455 additional genes grouped in five genomics islands (GIs) and six prophages (PPs). The aim of this study was to determine the implication of the accessory genome in LESB58 virulence. We performed a signature tagged mutagenesis (STM) followed by an *in vivo* screening of the mutants. From 162 STM mutants defective for *in vivo* maintenance, we selected 11 harbouring an insertion in GI or PP for further virulence analysis. Two of these mutants were used for genomics analysis in order to better understand their incapacity for *in vivo* maintenance in the rat model of chronic lung infection.

Avant-Propos

Avant toute chose, je tiens à remercier le Dr Roger Levesque qui m'a donné l'opportunité et les outils nécessaires pour réaliser mon projet au sein de son laboratoire. Également, un merci bien spécial à Irena Kukavica-Ibrulj, associée de recherche du Dr Levesque, pour tout son soutien, autant technique que moral. Ce long parcours qu'a été la réalisation de mon projet de maîtrise n'aurait jamais pu être traversé sans ta précieuse aide. Je garde en mémoire d'excellents souvenirs de mon passage dans le laboratoire du Dr Levesque et tiens à remercier quelques personnes avec qui j'ai eu le bonheur de travailler : le Dr Brian Boyle, sans qui plusieurs questions seraient demeurées sans réponse, ainsi que Simone Périnet et Alexia Calzina De Jong, toutes deux étudiantes à la maîtrise, avec qui j'ai pu rire, mais également partager mes frustrations! Finalement un remerciement à tous les collaborateurs et tous les gens ayant participé à l'avancement de mon projet de maîtrise, spécialement au Dr Steve Charette et son équipe, Dr Eric Déziel et Dre Joanne L. Fothergill.

Merci à toute ma famille pour votre immense compréhension. Ma mère Lynda, mon père Jean et mon frère Michaël. Également, un merci à mon cousin Ugo, qui est comme un frère pour moi et qui m'a toujours appuyé et encouragé du mieux qu'il le pouvait. Plus de deux années se sont écoulées et vous m'avez tous toujours supporté. Sans votre présence à mes côtés, la réussite de ce projet n'aurait pu être possible. Je tiens également à émettre un merci tout spécial à mes amies Andréanne, Mélissa et Sophie pour leur encouragement et leur présence à mes côtés. Toujours présentes, autant dans les moments les plus agréables, que les plus tristes.

Les méthodes et résultats de ce mémoire sont présentés sous forme d'article de publication qui sera soumis à *PLoS Pathogens* (chapitre 2). Une conclusion générale et des perspectives sont exposées à la suite de l'insertion de l'article (chapitre 3).

*À ma famille et mes amis qui ont toujours été
présents et m'ont fournis le courage et la
motivation pour ne jamais abandonner.*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	1
Liste des abréviations.....	2
Chapitre 1 : Introduction.....	4
1.1 La fibrose kystique.....	5
1.1.1 Désordres gastro-intestinaux et endocriniens.....	6
1.1.2 Infections pulmonaires.....	7
1.1.2.1 Théories et causes possibles.....	7
1.1.2.2 Colonisation et élimination bactérienne.....	9
1.1.2.2.1 Premières lignes de défense et colonisation bactérienne.....	9
1.1.2.2.2 Réaction inflammatoire et infection pulmonaire chronique.....	11
1.1.2.3 Traitements et thérapies.....	12
1.1.2.3.1 Infections pulmonaires : traitement des agents infectieux.....	13
1.1.2.3.2 Traitements symptomatiques.....	14
1.1.2.3.3 Thérapie génique.....	14
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.2.1 Facteurs de virulence associés à la bactérie.....	18
1.2.1.1 Production du biofilm et de l'alginate.....	18
1.2.1.2 Le flagelle.....	22
1.2.1.3 Les pili.....	24
1.2.2 Facteurs de virulence sécrétés.....	27
1.2.2.1 Enzymes protéolytiques.....	27
1.2.2.2 Enzymes lipolytiques.....	28
1.2.2.3 Toxines.....	29
1.2.2.4 Les chromophores.....	33
1.2.3 Système de régulation de l'expression des facteurs de virulence et sécrétion des protéines extracellulaires.....	34
1.2.3.1 Système de sécrétion à deux composantes.....	34
1.2.3.2 Quorum Sensing.....	35
1.2.3.3 Systèmes de sécrétion des facteurs de virulence.....	37
1.3 Organisation et structure du génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
1.3.1 Composantes majeures du génome accessoire de <i>P. aeruginosa</i>	39
1.3.1.1 ICES.....	39
1.3.1.2 Îlots de remplacement.....	39
1.3.1.3 IS et Tn.....	40
1.3.1.4 Prophages.....	40
1.3.2 Mutagenèse transpositionnelle à étiquettes spécifiques.....	44
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LES (Liverpool Epidemic Strain).....	47
1.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.....	48
1.5 Mise en situation du projet de recherche.....	51
1.5.1 Problématique.....	51

1.5.2 Hypothèse et objectifs	51
Chapitre 2.....	54
Génomique fonctionnelle des gènes essentiels à l'infection pulmonaire chronique et uniques chez la souche épidémique <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	54
2.1 Résumé	55
Genes from Prophage Islands of the Accessory Genome of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 Epidemic Strain are Essential for Chronic Pulmonary Infection	57
Chapitre 3 : Conclusion	91
Bibliographie	96
Annexe	114
Annexe A : Présentation au Congrès conjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, 2010	115
Annexe B : Présentation à la Journée de la recherche en médecine, 2011	117
Annexe C : Présentation au 13th International Pseudomonas Meeting, 2011	119
Annexe D : Présentation au Congrès de Bactériologie intégrative : Symbiose et Pathogenèse (BiSP), 2011	121
Annexe E : Présentation au Congrès coinjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, 2011	122

Liste des figures

Figure 1.1 Principaux facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i> et leurs interactions avec l'hôte.....	17
Figure 1.2 Cinq étapes majeures de la formation du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 1.3 Structure du flagelle bactérien chez <i>P. aeruginosa</i> et les principaux gènes qui lui sont associés.....	23
Figure 1.4 Pilus de type IV.....	26
Figure 1.5 Protéines effectrices du SSTT de <i>P. aeruginosa</i> et leurs effets sur les fonctions des cellules hôtes.....	32
Figure 1.6 Mécanismes moléculaires du QS chez <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 1.7 Ilots génomiques (GIs) identifiés chez <i>P. aeruginosa</i> LESB58.....	42
Figure 1.8 Prophages (PPs) identifiés chez <i>P. aeruginosa</i> LESB58.....	43
Figure 1.9 Représentation schématique de la STM chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	45
Figure 1.10 Représentation schématique de la STM chez <i>P. aeruginosa</i> LESB58.....	46
Figure 1.11 Localisation et persistance des souches <i>P. aeruginosa</i> PAO1, PA14 et LESB58 dans les poumons de rat sept jours post-infection.....	50

Liste des abréviations

ADP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AHL	N-acyl-homosérine lactone
ARNt	ARN-transfert
ARNm	ARN-messenger
ATP	Adénosine triphosphate
<i>attB</i>	Recombination site on bacterial chromosome
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Cup	Chaperone Usher Pathway
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
eEF-2	Facteur d'élongation 2 eucaryotique
EstA	Estérase A
ExoS	Exoenzyme S
ExoT	Exoenzyme T
ExoU	Exoenzyme U
ExoY	Exoenzyme Y
FAS	Facteur activant l'exoenzyme S
FK	Fibrose kystique
GAP	GTPase Activating Protein
GI	Genomic Island
GM1	Monosialoganglioside 1
ICEs	Integratives and conjugatives elements
IR	Inverted Repeat
IS	Insertion Sequence
I κ B	Inhibitor of kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
kb	Kilobase
Km	Kanamycine
LasA	ÉlastaseA
LasB	ÉlastaseB
LDL	Low-density Lipoprotein
LES	Liverpool Epidemic Strain
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL Receptor-related protein
Mpb	Millions de paire de bases
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PA	Protéase Alkaline
PAR	Protease-Activated Receptor
PASP	<i>P. aeruginosa</i> Small Protease
pb	Paire de bases
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
Pel	Pectate lysase
PERT	Pancreatic enzyme replacement therapy
PLC	Phospholipase C
PlcB	Phospholipase C beta
PlcH	Phospholipase C hémolytique
PlcN	Phospholipase C non-hémolytique
PMN	Neutrophiles polymorphonucléaires
PP	Prophage
PS	Phosphatidylsérine
Psl	Polysaccharide synthesis locus
qPCR	PCR quantitatif
QS	Quorum-Sensing
Ras	Retrovirus-Associated DNA Sequences
SBBO	Small Bowel Bacterial Overgrowth
SCV	Small-Colony Variant
SM	Sphingomyéline
SSTT	Système de sécrétion de type III
STM	Signature-Tagged Mutagenesis
Tc	Tetracycline
TLR	Toll-Like Receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Vfr	Virulence Factor Regulator

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La fibrose kystique

La fibrose kystique (FK), ou mucoviscidose, est une maladie génétique autosomale récessive affectant le gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) situé sur le chromosome humain 7 (Knowlton et al. 1985; Stanke et al. 2010; Wainwright et al. 1985). Le gène responsable de la maladie a été découvert en 1989 et a été identifié comme étant impliqué dans le transport des ions chlorures. (Kerem et al. 1989; Riordan et al. 1989) En raison de l'expression du CFTR dans la membrane de cellules épithéliales de plusieurs tissus différents, les symptômes liés à la maladie sont nombreux. La maladie est causée par différents types de mutation dans le gène CFTR, causant son inactivation ou encore la production d'un transcrit non-fonctionnel. À ce jour, plus de 1800 mutations ont été identifiées. Le type de mutation le plus fréquemment (40,65 % des cas) rencontré est une mutation non-sens (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium accessed May 3, 2011). La mutation non-sens la plus répandue (70 % des cas) est une délétion de trois acides aminés correspondant à la perte d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) causant la production d'une protéine non-fonctionnelle. Cette mutation entraîne une défaillance dans le fonctionnement du transport des ions chlorures, se traduisant par une imperméabilité des membranes cellulaires à ces ions (Kerem et al. 1989; Welsh and Smith 1995). Concrètement, l'eau reste emprisonnée dans les cellules, ce qui entraîne une mauvaise hydratation des différents mucus. Plusieurs fonctions de régulation du transport de molécules exécutées par ce gène sont également affectées : le transport du sodium, la régulation de l'ATP, le transport des vésicules intracellulaires, etc. (Antigny et al. 2008; Chmiel, Berger and Konstan 2002). Les manifestations cliniques chez les patients FK peuvent être très variées dépendamment du type de mutation qui affecte le gène CFTR. Deux désordres majeurs sont en lien avec la maladie : l'infection et l'inflammation pulmonaire chronique (se déclare généralement chez le nourrisson, quelques mois après sa naissance) (Khan et al. 1995) et les troubles gastro-intestinaux et endocriniens. Les patients FK souffrent généralement d'insuffisance pancréatique ce qui, combiné aux divers désordres tels que la malabsorption des nutriments et la production de sécrétion intestinale épaisse, entraîne des carences nutritives importantes (Dodge 1986).

1.1.1 Désordres gastro-intestinaux et endocriniens

La FK est la principale cause d'insuffisance pancréatique chez les enfants bien que, de nos jours, ce symptôme de la maladie se contrôle assez bien à l'aide de divers traitements tels que l'administration d'enzymes pancréatiques (*Pancreatic Enzyme Replacement Therapy* (PERT)). En effet, 90 % des patients FK sont atteints d'insuffisance pancréatique due à la sécrétion réduite d'enzymes exocrines pancréatiques en plus de troubles digestifs importants tels que la stéatorrhée, des douleurs abdominales, des problèmes de motilité intestinale, la constipation et une carence alimentaire due à une malabsorption des nutriments (Borowitz et al. 2005; Gaskin et al. 1991; United Kingdom Database accessed June 15th, 2011). D'autres problèmes de santé associés au système endocrinien et au système digestif sont rapportés chez ces patients. On dénombre un taux élevé de diabète chez les personnes FK ainsi qu'une sécrétion biliaire anormale associée à une détérioration progressive du foie, ayant pour résultat une cirrhose multilobulaire dans plusieurs cas (Sokol and Durie 1999).

Le gène CFTR est reconnu pour jouer un rôle important dans les voies de sécrétion du bicarbonate pancréatique et intestinale qui sont impliquées dans la régulation du pH duodénal. En effet, chez les personnes FK, la sécrétion basale de HCO_3^- dans la muqueuse duodénale est réduite et la stimulation de la sécrétion de HCO_3^- par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est absente. Chez les personnes saines, l'exposition de la muqueuse duodénale à un pH acide déclenche la sécrétion de HCO_3^- qui agit comme neutralisant. Bien qu'une concentration basale soit sécrétée chez les FK, la magnitude de sécrétion de HCO_3^- est amoindrie par l'activité de la voie de transport Na^+/H^+ . En fait, il a été démontré que lorsqu'il y a stimulation d'AMPC duodénale chez les personnes FK, l'activité Na^+/H^+ est inhibée plutôt que ce soit le niveau de sécrétion de HCO_3^- qui soit augmenté (Pratha et al. 2000). L'acidification anormale de l'intestin résultant de ce déséquilibre du niveau de sécrétion $\text{HCO}_3^- / \text{Na}^+$ contribuerait à la malabsorption des graisses chez les personnes FK indépendamment de son effet sur l'activité enzymatique pancréatique (Borowitz et al. 2005).

La colonisation inappropriée du petit intestin (*Small Bowel Bacterial Overgrowth* (SBBO)) est un autre problème d'ordre gastro-intestinal rencontré fréquemment chez les patients FK . La production anormale d'un mucus épais sur la paroi intestinale prédispose les patients FK au SBBO. La nature du mucus produit étant altérée et d'une consistance beaucoup plus épaisse procure un milieu favorable à la colonisation bactérienne en plus de bloquer la première ligne de défense immunitaire plutôt que de procurer une protection antimicrobienne, comme c'est le cas chez les personnes saines. La SBBO peut causer de l'inflammation et des dommages à la muqueuse intestinale qui affectent la digestion et l'absorption des graisses, glucides et protéines et donc contribue directement à la malabsorption des nutriments (Clarke et al. 2004; Fridge et al. 2007; Sherman et al. 1987). Une étude réalisée sur des souris FK (*CFTR null mouse*) en 2004 par un groupe de *University of Kansas School of Medicine* a permis de constater qu'en comparaison avec un modèle sain, on observe une surexpression de plusieurs gènes associés à l'inflammation et à l'immunité innée et une surproduction de molécules immunitaires telles que les mastocytes et les neutrophiles (Norkina et al. 2004).

1.1.2 Infections pulmonaires

1.1.2.1 Théories et causes possibles

L'infection pulmonaire causée par *Pseudomonas aeruginosa* demeure la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients FK (Rapport du Registre canadien de données sur les patients FK 2008). Pour expliquer cette prévalence à l'infection, quatre théories majeures sont mises en évidence par la communauté médicale et scientifique.

La première hypothèse, très répandue, stipule que le dysfonctionnement du CFTR entraîne la perte de l'inhibition des canaux sodiques épithéliaux menant à un excès de sodium et à une réabsorption de l'eau, d'où la déshydratation de la surface des voies respiratoires. De façon concomitante, l'incapacité au transport des ions chlorures empêche de rétablir cette déshydratation. Il en résulte une réduction de la lubrification entre l'épithélium et le mucus empêchant un bon mouvement ciliaire qui diminue la capacité d'expectoration du patient et

emprisonne les microorganismes dans les voies respiratoires. Le poumon du patient devient alors une niche potentielle pour les microorganismes (Boucher 2007).

La seconde théorie rencontrée propose que chez les patients FK, l'excès de sodium et de chlorure dû au dysfonctionnement du CFTR soit retenu par le liquide présent à la surface des voies respiratoires. Le milieu hypertonique ayant un effet inhibiteur sur les molécules antimicrobiennes constituant la première ligne de défense du système immunitaire, les voies respiratoires deviennent alors un environnement propice au développement infectieux. (Smith et al. 1996).

La troisième théorie suggère que le CFTR agit comme récepteur liant *P. aeruginosa* et que le dysfonctionnement du gène chez les patients FK a un impact important sur l'élimination du microorganisme dans les voies respiratoires. En effet, chez l'hôte normal, *P. aeruginosa* se lie à un CFTR fonctionnel et initie une réponse immunitaire innée rapide et locale. Chez l'hôte FK, l'augmentation de monosialoganglioside 1 (GM1) à la membrane cellulaire apicale permet la liaison de *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sans initiation de la réponse immune innée médiée par le CFTR. (Campodonico et al. 2008; Darling, Dewar and Evans 2004; Imundo et al. 1995) Il en résulte donc que chez les personnes FK, il y a à la fois une augmentation de l'affinité pour l'attachement des bactéries à l'épithélium et une perte de la réponse immune innée locale.

La dernière théorie la plus souvent rencontrée est basée sur la dérégulation de la réponse inflammatoire chez l'hôte comme effet primaire de la FK. Le dysfonctionnement du CFTR favorise l'augmentation de molécules pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-8 (IL-8) et IL-6, le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) et l'activation de la voie de *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B). En même temps que cette stimulation hyperinflammatoire se produit, il y a diminution de la concentration des substances anti-inflammatoires naïves telles que l'IL-10, le lipoxin et l'acide docosahexanoïque ce qui engendre une dérégulation entre molécules pros et anti-inflammatoires, sans relâche de l'inflammation des tissus pulmonaires (Karp et al. 2005; Venkatakrishnan et al. 2000; Weber et al. 2001).

Ces quatre théories ne sont pas en contradiction et chacune d'elles pourrait être, en fait, une partie de la réponse. Combinées, elles peuvent effectivement assez bien expliquer la prédisposition des patients FK à l'infection pulmonaire : microenvironnement permissif formé par les plaques de mucus, augmentation de l'affinité de liaison bactérienne à l'épithélium, diminution de la capacité d'expectoration du mucus (et des microorganismes qu'il contient), diminution de la réponse immunitaire innée. La prochaine partie reprendra ces théories plus en détail et dans un contexte de colonisation pulmonaire bactérienne et de stimulation des défenses de l'hôte chez les personnes FK et non FK.

1.1.2.2 Colonisation et élimination bactérienne

Lors d'une infection microbienne pulmonaire, différentes lignes de défense de l'hôte sont activées en réponse à la présence du pathogène. Ces lignes de défense se composent des barrières mécaniques qui éliminent physiquement les pathogènes, telles que la clairance mucociliaire, de l'activation de l'immunité innée et, finalement, de l'activation de l'immunité acquise en dernière ligne. Chez les patients FK, l'infection pulmonaire chronique caractéristique implique d'abord une réponse mécanique non spécifique et non inflammatoire impliquant des IgA. L'inefficacité de cette réponse à éradiquer l'infection conduira à la réponse inflammatoire caractéristique de l'immunité innée. Cette réponse immunitaire peut avoir d'importants effets secondaires pour l'hôte. L'élimination de l'infection doit être bénéfique pour l'hôte et donc il doit y avoir un équilibre entre élimination du pathogène et dommages collatéraux pour l'hôte. Dans le cas des colonisations pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients FK, ce n'est malheureusement pas le cas.

1.1.2.2.1 Premières lignes de défense et colonisation bactérienne

Les personnes atteintes de FK ont des fluides respiratoires beaucoup plus épais et visqueux que la normale. La clairance mucociliaire au sein des voies respiratoires est très difficile, voire impossible. En effet, le battement des cils est inhibé par la diminution du liquide à la surface des voies respiratoires et la consistance du mucus s'y trouvant. Les

microorganismes, le plus souvent *Pseudomonas aeruginosa*, restent emprisonnés et adhèrent à l'épithélium respiratoire. L'immunité innée, composée de cellules phagocytaires, fait son entrée. Les neutrophiles polymorphonucléaires, également appelés PMNs, et les macrophages alvéolaires sont recrutés au site infectieux (Boucher 2007; Lyczak, Cannon and Pier 2002). Les macrophages sont activés par la reconnaissance des *Toll-Like Receptor* (TLR) présents à la surface des cellules ou encore par les *Nod-Like Receptor* (NLR) dans le cytosol et vont phagocyter les pathogènes et produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Fritz et al. 2006; Kooguchi et al. 1998). Ces molécules de l'immunité innée sont également critiques dans le recrutement des neutrophiles et autres molécules immunitaires (Cheung, Halsey and Speert 2000; Hashimoto et al. 1996). Les neutrophiles sont également très importants dans l'élimination de pathogènes pulmonaires. Chez les personnes saines, le recrutement des neutrophiles permet, de façon générale, l'élimination du pathogène et la résolution de la réponse inflammatoire lorsque l'infection est contrôlée. Par contre, comme la réponse immunitaire innée n'est pas spécifique, il est possible que certaines molécules produites par les cellules immunitaires telles que différentes protéases (élastase), des metalloprotéinase et des myeloperoxydases, produisent des dommages aux tissus pulmonaires (Meyer and Zimmerman 1993; Ras et al. 1992).

Chez les personnes FK, plusieurs facteurs associés à la déficience du transport des ions chlorures contribuent à modifier cette réponse immunitaire de première ligne. Il a été suggéré que dû à la concentration élevée d'ions chlorures et au changement de la composition ionique du liquide de surface pulmonaire, les neutrophiles seraient défectueux pour la phagocytose et auraient un taux d'apoptose plus élevé qu'en temps normal (Tager, Wu and Vermeulen 1998). Également, ce liquide présent à la surface des voies respiratoires est composé de peptides antimicrobiens tels que des β -defensines, du lysozyme et de la lactoferrine et est normalement impliqué dans la défense contre les pathogènes. Le changement de composition ionique inhibe l'activité antimicrobienne qu'il possède, ce qui favorise l'initiation et l'établissement des microorganismes dans les voies respiratoires (Goldman et al. 1997; Smith et al. 1996).

Un autre mécanisme favorisant la colonisation des voies respiratoires par *P. aeruginosa* due à la mutation du CFTR est l'augmentation de l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales respiratoires. Cette étape est cruciale dans le processus de colonisation bactérienne. Cette adhérence fait intervenir d'une part des récepteurs se trouvant à la surface des muqueuses respiratoires de l'hôte (asialogangliosides-1 (asialoGM1) et -2 (asialoGM2)) et, d'autre part, des adhésines bactériennes. On observe une augmentation de l'expression et de l'exposition de GM1 associée aux dommages et lésions de l'épithélium respiratoire. De fait, les dommages et lésions du tissu pulmonaire augmentent les risques de contraction d'une infection à *P. aeruginosa*. Il a également été observé que ces glycolipides membranaires asialylés sont plus denses à la surface des cellules FK. La séquence tétrasaccharidique retrouvée sur ces récepteurs constitue le site d'ancrage de la piline bactérienne principalement, mais également de la flagelline (de Bentzmann et al. 1996; Saiman and Prince 1993). Plus précisément, la région C-terminale de la protéine de la piline est impliquée dans l'attachement de la bactérie au glycolipide (Lee et al. 1994).

1.1.2.2.2 Réaction inflammatoire et infection pulmonaire chronique

Le processus inflammatoire est caractéristique d'un recrutement massif de neutrophiles dans les voies respiratoires. Les neutrophiles sont des médiateurs importants dans la chimiotaxie de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Il a été démontré que le taux de molécules pro-inflammatoires était supérieur dans les lavages bronchoalvéolaires (BAL) chez personnes FK que chez les non FK. En effet, on retrouve une plus grande concentration d'IL-8, d'IL-6, de TNF- α et d'IL-1 β chez les patients FK (Bonfield et al. 1995b). Ce sont toutes des molécules pro-inflammatoires produites suite à l'activation et la stimulation des macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales, bien que la source majeure de production d'IL-8, la chimiokine la plus abondante retrouvée dans les BAL-FK, soit les neutrophiles (Armstrong et al. 1995; Balough et al. 1995; McElvaney et al. 1992). Une étude menée sur des nourrissons FK démontre que les BALs de ces jeunes patients contiennent de l'IL-8 en absence d'infection (Bonfield, Konstan and Berger 1999; Khan et al. 1995). L'hyperproduction d'IL-8 stimule le recrutement massif de neutrophiles qui lui-même stimule la production d'IL-8. La production excessive de molécules pro-

inflammatoires et leur persistance en l'absence de stimulus (d'infection) suggèrent fortement une dérégulation dans le processus inflammatoire chez les personnes FK (Bonfield et al. 1999; Bonfield et al. 1995a; Kube et al. 2001; Stecenko et al. 2001). Lorsqu'une infection aiguë est contrôlée, certaines cytokines anti-inflammatoires sont normalement produites par les macrophages et les cellules épithéliales. C'est le cas notamment pour l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire importante et constitutivement produite par les cellules épithéliales des voies respiratoires des personnes saines (Bonfield et al. 1995a). L'IL-10 agit en réprimant la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et en augmentant la production d'*Inhibitor of kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (IκB) (Lentsch et al. 1997; Schottelius et al. 1999). IκB est un inhibiteur de l'activation de NF-κB, un facteur de transcription important dans la signalisation intracellulaire pour la production de cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 produite au sein de l'épithélium pulmonaire n'est pas constitutivement exprimée chez les personnes FK. En effet, il a été observé que les fluides recueillis des BALs-FK étaient déficients en IL-10 en comparaison avec les BALs de personnes non FK (Bonfield et al. 1995a; Bonfield et al. 1995b). Il y a donc une surexpression des molécules pro-inflammatoires et une répression des molécules anti-inflammatoires. Un autre fait important qui caractérise les infections pulmonaires chez les personnes FK est la prédominance des neutrophiles en continu. On associe ces molécules à l'infection aiguë et non pas chronique. En ce sens, les patients FK semblent avoir une réponse inflammatoire primaire aiguë prolongée au lieu d'être une réponse inflammatoire à l'infection chronique habituelle impliquant, par exemple, les granulocytes.

1.1.2.3 Traitements et thérapies

Afin de permettre aux personnes FK de profiter d'une qualité de vie, diverses thérapies sont mises sur pieds. Plusieurs sont encore à la phase clinique et d'autres sont bien connues et utilisées. Les différentes avenues thérapeutiques utilisées ou en développement sont très variées quant à leur cible. En effet, certains traitements ont pour cible les agents infectieux, d'autres tentent de diminuer les symptômes les plus néfastes de la maladie et certains essaient de rétablir la fonction du CFTR par des thérapies géniques.

1.1.2.3.1 Infections pulmonaires : traitement des agents infectieux

Dans le traitement des pathogènes pulmonaires chez les FK, deux avenues sont possibles : l'utilisation d'antibiotiques à des fins de prophylaxie ou d'éradication (précoce ou chronique). L'utilisation d'antimicrobiens de façon chronique en prophylaxie vise à prévenir l'infection dans un premier temps, mais également à prévenir les dommages subséquents causés aux poumons (Heinzl et al. 2002). Cependant, l'utilisation à long terme d'un agent antibactérien peut mener à des problèmes de toxicité pour l'hôte dus à une accumulation de la drogue dans l'organisme et également à l'émergence de souches bactériennes résistantes.

Le traitement précoce contre les infections pulmonaires FK se fait dès le premier isolement du microorganisme. À ce stade, les isolats de *P. aeruginosa* responsables de la majorité des infections pulmonaires FK ne présentent pas encore d'aspect mucoïde et de multi-résistance et sont donc potentiellement sensibles aux antibiotiques anti-pseudomonas en plus d'être en faible nombre. Il s'agit donc de traiter le patient avec des doses d'antibiotiques très agressives, la plupart du temps en combinant traitement inhalatoire et intraveineux. Le traitement précoce permet une prévention de l'infection chronique ou, du moins, la retarde (Ratjen 2006; Rosenfeld, Ramsey and Gibson 2003; Treggiari et al. 2007). Lorsque l'infection chronique s'est installée, il est beaucoup plus difficile de l'éradiquer. Les traitements antibiotiques sur de longues périodes auront pour objectifs de diminuer la charge microbienne et augmenter la capacité pulmonaire des patients (Ramsey et al. 1999; Saiman et al. 2003).

L'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux antibiotiques est primordiale pour maintenir la qualité de vie des patients FK. Les infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* sont leur plus grande cause de mortalité et morbidité et donc le traitement de ces infections doit être mis en priorité malgré le grand nombre de problèmes qui y sont reliés. En effet, en plus de la multi-résistance de *P. aeruginosa* et de la constante émergence de nouvelles souches toujours plus agressives, certains patients ne tolèrent pas

les traitements antibiotiques dus aux effets secondaires ou encore développent des allergies aux différentes drogues utilisées (Edson et al. 2004; Hoffmann et al. 2002)

1.1.2.3.2 Traitements symptomatiques

Les symptômes les plus souvent rencontrés chez les personnes FK sont les désordres gastro-intestinaux (plus particulièrement l'insuffisance pancréatique) et les désordres pulmonaires (Rapport du Registre canadien de données sur les patients FK 2008). Le traitement pour palier à l'insuffisance pancréatique consiste à remplacer l'amylase, la lipase et la protéase que le pancréas des patients n'est pas en mesure de sécréter par une formulation d'enzymes pancréatiques exogènes (PERT) (Ferrone, Raimondo and Scolapio 2007). En ce qui concerne les troubles pulmonaires, il y a divers traitements antibiotiques comme déjà mentionnés, mais également des techniques physiques pour améliorer la clairance mucociliaire (Flume et al. 2009). Également, certaines thérapies pharmacologiques sont en mesure de diminuer la viscosité du mucus pulmonaire pour en faciliter la clairance en réhydratant la surface pulmonaire par inhalation d'une saline hypertonique (Fuchs et al. 1994). D'autres thérapies permettent la diminution de l'inflammation suite à l'infection à l'aide d'une médication d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et de corticostéroïdes (Eigen et al. 1995; Konstan et al. 1995).

1.1.2.3.3 Thérapie génique

La thérapie génique a pour but de remplacer la perte de fonction du gène CFTR en introduisant une partie ou encore la totalité du gène dans les cellules épithéliales pulmonaires. Cette voie thérapeutique prometteuse comporte toutefois plusieurs difficultés à surmonter. Les cellules ciblées sont des cellules différenciées et cela implique qu'elles ont une durée de vie limitée et que le transfert génique devra continuellement être refait. L'utilisation de vecteurs viraux tels que les adénovirus est préconisée en raison de leur capacité à infecter le système respiratoire (Kohlmeier and Woodland 2009; Walters et al. 1999). De nouveaux horizons sont également considérés. Les potentialisateurs et les correcteurs sont deux catégories de molécules permettant le fonctionnement du CFTR chez

les personnes FK. Les potentialisateurs auraient comme fonction d'augmenter le temps d'ouverture du canal CFTR et permettre le passage des ions chlorures (Ai et al. 2004; Wellhauser et al. 2009). Les correcteurs, eux, faciliteraient le mouvement de la protéine CFTR mutante hors du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique apicale et permettraient ainsi d'éviter la dégradation intracellulaire (Bebok et al. 1998; Rubenstein, Egan and Zeitlin 1997; Rubenstein and Zeitlin 1998).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille mobile à Gram négatif pourvu d'un flagelle monotriche. Ce microorganisme ubiquitaire est capable d'infecter un vaste spectre d'hôtes. En effet, *P. aeruginosa* est responsable de la colonisation d'une variété de niches écologiques ainsi que de plantes, de mammifères, d'insectes et également de protozoaires (Pukatzki, Kessin and Mekalanos 2002; Rahme et al. 1995; Sibley et al. 2008). Il est normalement retrouvé dans l'eau, le sol et sur les plantes sous forme planctonique ou dans un biofilm. Bien que ce chimiohétérotrophe préfère un environnement aérobie utilisant l'O₂ comme accepteur final d'électron, il est capable d'utiliser des nitrates en milieu anaérobie (Prescott 2003). Il est retrouvé chez l'humain en tant que pathogène opportuniste. *P. aeruginosa* est associé aux infections nosocomiales (dans les hôpitaux) suite à l'installation de cathéters urinaires ou encore chez les patients ayant recours à des appareils permettant la respiration mécanique. Ce pathogène est également responsable des bactériémies chez les grands brûlés et est fréquemment associé aux infections chez les personnes immunosupprimées (patients sidatiques ou ayant reçu des traitements de chimiothérapie). Comme précédemment mentionné, l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* est la première cause de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Stover et al. 2000).

P. aeruginosa possède un certain nombre de facteurs de virulence lui permettant de s'adapter au milieu environnant et de s'y établir, expliquant ainsi son implication dans une si grande variété d'infections. C'est également en bonne partie dû à ses facteurs de virulence que le microorganisme est en mesure d'établir une infection pulmonaire

chronique chez les personnes FK suite à la colonisation pulmonaire (Govan and Deretic 1996; Nicas and Iglewski 1985; Passador L 1995; Woods and Iglewski 1983). Deux principales classes de facteurs de virulence sont distinguées chez *P. aeruginosa* : les facteurs de virulence associés à la bactérie (structures impliquées dans l'adhérence, la mobilité ou l'immunogénicité) et les facteurs de virulence sécrétés (enzymes protéolytiques et lipolytiques, certaines toxines et les chromophores). La **figure 1.1** représente les principaux facteurs de virulence pour chacune des deux classes et leurs interactions bactérie-hôte.

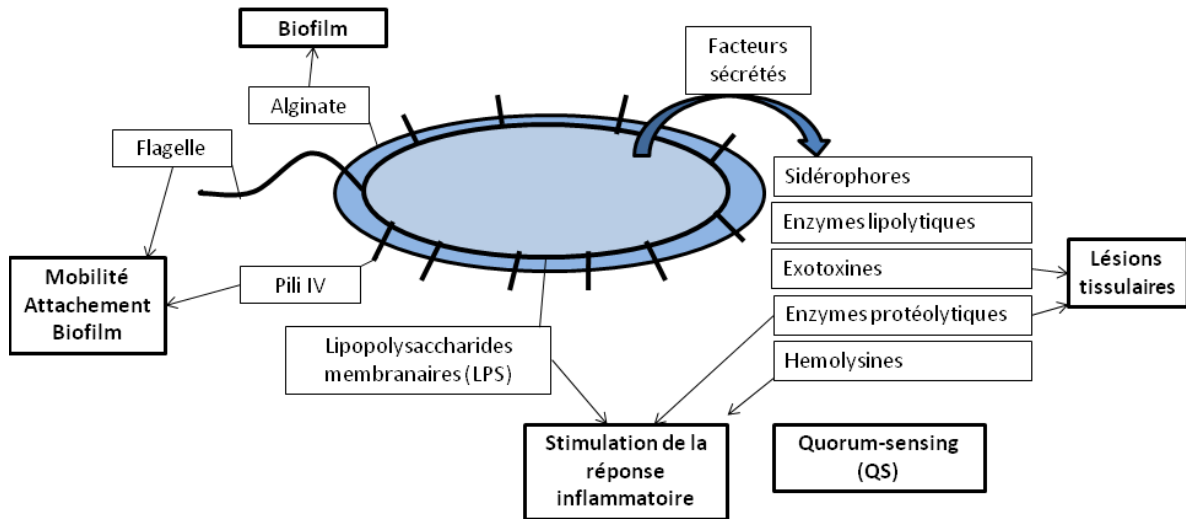


Figure 1.1 Principaux facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* et leurs interactions avec l'hôte.

Les facteurs de virulence associés à la bactérie sont impliqués dans les processus moteurs de la virulence bactérienne (mobilité, adhérence, formation du biofilm) alors que les facteurs de virulence sécrétés, majoritairement dépendants du QS, sont plus associés aux dommages faits à l'hôte et à la réponse immune. Inspiré de Christian Van Delden, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York (Van Delden and Iglewski 1998).

1.2.1 Facteurs de virulence associés à la bactérie

1.2.1.1 Production du biofilm et de l'alginate

Selon les différents stades de l'infection, différents composés sont produits par la bactérie dans le but de se protéger et de se créer un environnement propice à la croissance. Par exemple, le Psl (*Polysaccharide synthesis locus*) et le Pel (*Pectate lysase*) sont deux exopolysaccharides sécrétés au stade précoce de l'infection suite à la colonisation. Le Psl, riche en mannose et galactose, est impliqué dans l'attachement et la maturation du biofilm (Ma et al. 2009) alors que Pel, riche en glucose, agit comme un polymère de cellulose en formant une pellicule à l'interface air-liquide et a été identifié comme étant un composé pilier dans l'échafaudage de la structure du biofilm (Colvin et al. 2011; Friedman and Kolter 2004). Le biofilm, une matrice composée en partie d'exopolysaccharides comme ceux précédemment présentés, enrobe la bactérie et lui assure une protection contre les dangers extérieurs tels que les antibiothérapies et la réponse immunitaire de l'hôte qu'elle infecte (Costerton, Stewart and Greenberg 1999; Mathee et al. 1999). Le développement de l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez les patients FK est associé à l'émergence de souches ayant acquis ce phénotype mucoïde (Pedersen et al. 1992) lié à la sécrétion d'alginate (Govan and Deretic 1996), un exopolysaccharide polyanionique composé d'acide uronique et directement impliqué dans le biofilm (Remminghorst, Hay and Rehm 2009). L'alginate est considéré comme un facteur de virulence puisqu'il contribue à diminuer la susceptibilité du biofilm aux antibiotiques et aux mécanismes de défense naturels de l'hôte en diminuant l'efficacité de la clairance ciliaire et en augmentant l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales (Nivens et al. 2001; Pier et al. 2001). De plus, l'alginate protège *P. aeruginosa* des défenses immunitaires de l'hôte telles que l'inflammation, en inhibant l'activation du complément, et la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles (Cabral, Loh and Speert 1987; Meshulam et al. 1984). Une étude effectuée par Pedersen et coll. (Pedersen et al. 1992), a permis de démontrer la présence accrue d'anticorps IgA chez les patients FK infectés par une souche mucoïde de *P. aeruginosa*, en plus d'une faible condition clinique et d'une capacité de la fonction pulmonaire (*forced vital capacity*) amoindrie.

Le biofilm est constitué d'une communauté bactérienne bien structurée et de divers polysaccharides sécrétés par les microorganismes tels que l'alginate, les acides nucléiques libres et les protéines. Il peut s'agir d'une communauté bactérienne comprenant un seul type d'organisme ou encore une très grande variété d'individus. Les cellules planctoniques libres et mobiles, suite à divers signaux extérieurs, se rassemblent et adhèrent à une surface solide (Costerton et al. 1994). L'adhérence initiale des cellules fait intervenir diverses adhésines incluant le flagelle (O'Toole and Kolter 1998a) et les facteurs d'attachement de type *fimbriae* (Vallet et al. 2001). Les pili sont également impliqués dans les premières étapes de formation du biofilm puisqu'ils sont responsables du déplacement des bactéries sur les différentes surfaces (Merz, So and Sheetz 2000) ce qui permet la formation de micro-colonies et, plus tard dans le cycle, de macro-colonies. Lorsque les pili entrent dans le processus de formation du biofilm, l'attachement des cellules devient irréversible (Marshall 1992) et il y a formation de micro-colonies qui se regroupent et forment des macro-colonies. La différenciation de ces macro-colonies conduit au développement du biofilm comme tel (Costerton et al. 1999). S'en suivent maturation et croissance, tous deux dépendant du quorum-sensing (QS) et impliquant la sécrétion d'alginate qui est associé au phénotype mucoïde de la souche au stade chronique de l'infection pulmonaire à *P.aeruginosa* (Govan and Deretic 1996). La **figure 1.2** représente les grandes étapes de la formation du biofilm telles qu'expliquées précédemment.

Le biofilm est considéré comme un facteur de virulence puisque celui-ci rend les bactéries qui le composent d'une part beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et, d'autre part, beaucoup plus tolérantes aux défenses mécaniques et inflammatoires de l'hôte. La résistance des bactéries sous forme de biofilm aux antibiotiques peut être due à plusieurs facteurs. D'abord, le temps de génération des microorganismes est beaucoup plus long à l'état sessile que planctonique (Brown, Collier and Gilbert 1990). Également, le niveau de base d'oxygène est plus faible dans le biofilm, ce qui ralentit davantage la courbe de croissance et le développement de *P. aeruginosa*. Une croissance plus lente du microorganisme diminue sa susceptibilité aux antibiotiques puisque ce développement moins rapide entraîne une diminution de la perméabilité membranaire des cellules (Anwar, Dasgupta and Costerton 1990; Gilbert, Collier and Brown 1990). Une barrière physique

due à la présence d'alginate est également à considérer. À titre d'exemple, une barrière peut-être créée par les polymères d'alginate qui possèdent une charge négative et qui se lient aux aminoglycosides qui possèdent une charge positive. Les aminoglycosides seront ensuite dégradés par diverses enzymes, elles aussi immobilisées dans la matrice d'exopolysaccharides (Anwar, Strap and Costerton 1992; Stewart 1996). La réponse inflammatoire des PMNs produit des radicaux libres d'oxygène et il a été démontré que la présence de ces radicaux induit des mutations du gène *muca* ce qui conduit à un changement de phénotype (non-mucoïde à mucoïde) chez *P. aeruginosa* (Hoiby et al. 2001). Il a également été démontré que la présence du biofilm et de l'alginate protègent les bactéries de la phagocytose par les leucocytes. En effet, la matrice de biofilm limite la pénétration des leucocytes et de leurs produits antimicrobiens (Leid et al. 2005).

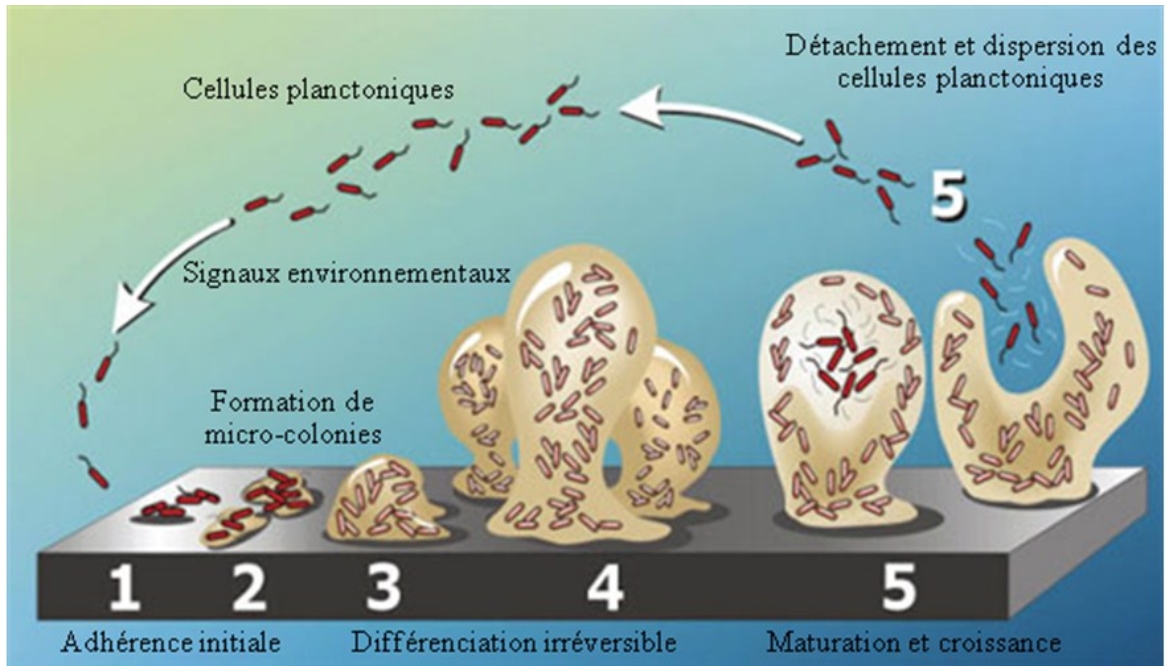


Figure 1.2 Cinq étapes majeures de la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*

 tapes majeures dans la formation du biofilm par *P. aeruginosa*. En réponse aux signaux environnementaux, les bactéries planctoniques et mobiles adh rent à une surface et s'y accumulent en formant des micro-colonies, puis des macro-colonies. Il y a ensuite différenciation des cellules, croissance et maturation du biofilm.   la fin de la formation du biofilm, il y a détachement d'une région du biofilm qui permet aux cellules planctoniques de recommencer le cycle. Adapté d'après David G. Davies, Binghamton, New York (Davies 2003).

1.2.1.2 Le flagelle

Le flagelle bactérien est une structure associée à deux types de mobilité : le *swimming* et le *swarming* (Kohler et al. 2000). La structure du flagelle est composée d'un corps basal situé dans la membrane cytoplasmique interne, d'un crochet permettant l'ancrage du filament dans la membrane cytoplasmique externe et d'une pointe à l'extrémité distale du filament. Tel que schématisé sur la **figure 1.3**, le corps basal est constitué principalement du complexe moteur rotatif permettant au filament d'agir telle une hélice, d'un système de transport (système de sécrétion de type III) et de disques permettant d'orienter le sens de rotation (Berg 1996). Le filament est composé d'un empilement de monomères de flagelline qui sont transportés et ajoutés à la pointe par une protéine de *capping* (FliD) (Bardy and Jarrell 2003; Yonekura et al. 2000). Chez *P. aeruginosa*, il n'y a qu'un seul flagelle polaire. L'implication du flagelle dans la virulence bactérienne est connue et bien documentée. Il a été démontré qu'en absence de flagelle, *P. aeruginosa* perdait de sa virulence (Montie et al. 1982). En effet, la perte d'expression des gènes du flagelle et de mobilité chez *P.aeruginosa* a été associée à l'augmentation de la sévérité des symptômes chez les patients FK infectés (Luzar, Thomassen and Montie 1985; Mahenthiralingam, Campbell and Speert 1994) alors que la diminution de l'expression de ces gènes confère un avantage pour la survie du microorganisme en regard au système immunitaire de l'hôte. La flagelline composant le flagelle est reconnue par le récepteur TLR5 (*Toll-Like Receptor*) (Balloy et al. 2007; Smith et al. 2003). Le TLR5 joue un rôle particulier dans la voie de signalisation inflammatoire. L'activation du TLR5 suite à la reconnaissance de la flagelline déclenche une cascade inflammatoire impliquant l'activation de NF- κ B et le recrutement des macrophages produisant des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8 et TNF α (Imler and Zheng 2004; Mahenthiralingam and Speert 1995; Means et al. 2003).

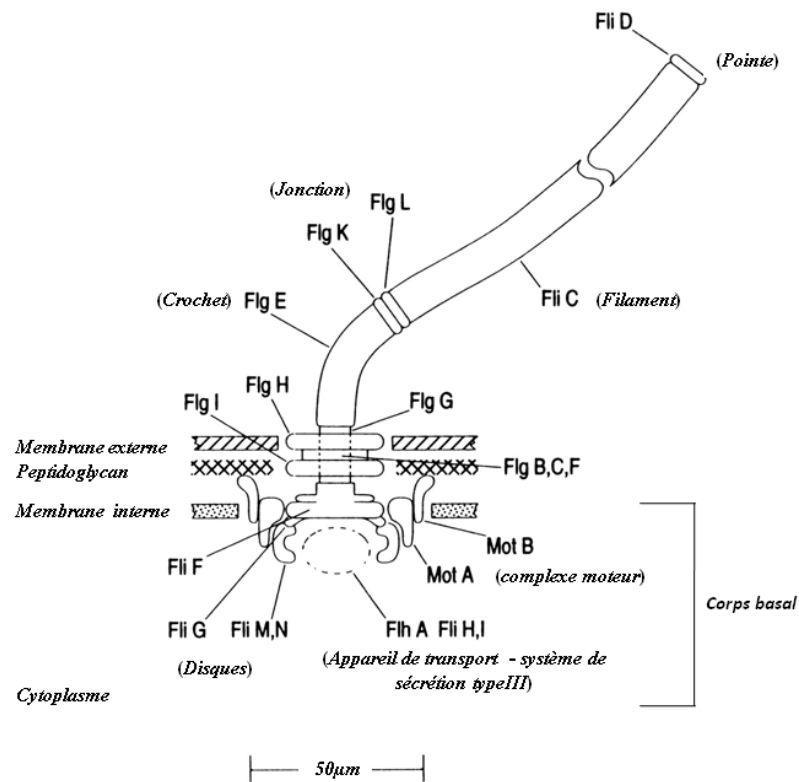


Figure 1.3 Structure du flagelle bactérien chez *P. aeruginosa* et les principaux gènes qui lui sont associés

Le filament (FliC) est composé d'un empilement de monomères de flagelline qui sont transportés et ajoutés la pointe par une protéine de *capping* (FliD). Adapté d'après Howard C. Berg, Harvard University, Cambridge (Berg 1996).

1.2.1.3 Les pili

Le pilus de type IV est une structure protéique filamenteuse retrouvée à la surface de la paroi des bactéries Gram-négative telles que *P. aeruginosa*. Le pilus de type IV est essentiel pour l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales (Bertrand, West and Engel 2010; Hahn 1997) et il est impliqué dans les mobilités de type *twitching* (Wall and Kaiser 1999) et de type *swarming* (Kohler et al. 2000). Le pilus est constitué de monomères de piline (PilA) (Mattick 2002), mais sa biosynthèse et son fonctionnement impliquent une diversité de gènes incluant des régulateurs transcriptionnels (*pilR*, *pilS*, *fimS*, *algR* et *rpoN*) (Hobbs et al. 1993; Strom and Lory 1993; Whitchurch, Alm and Mattick 1996), des gènes ayant une homologie avec les gènes du chimiotactisme *che* (*pilG-L*, *chpA*, *chpB*) (Darzins 1993, 1994; Whitchurch et al. 2004), des gènes structuraux (*pilA-F*, *pilM-Q*, *pilV-Z*, *fimT*, *fimU*) (Mattick 2002) et des gènes participant au fonctionnement des pili (*pilT* et *pilU*) (Graupner et al. 2001). Les gènes *pilE*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *fimT*, et *fimU* encodent des protéines formant des sous-unités minoritaires qui sont nécessaires pour l'assemblage des pili, la mobilité et l'infection par les phages (Alm et al. 1996; Alm and Mattick 1995; Mattick, Whitchurch and Alm 1996). La **figure 1.4** permet de voir le fonctionnement global du pilus de type IV. Les pili adhèrent à des récepteurs spécifiques aux cellules épithéliales par leur extrémité distale. Chez *P. aeruginosa*, le pilus possède une région C-terminale semi-conservée de 12 à 17 acides aminés qui est exposée à la pointe distale du pilus et qui lie la région carbohydratée des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2 se trouvant à la surface des cellules épithéliales (Hahn 1997; Hazes et al. 2000; Lory and Strom 1997). Le passage du pilus de type IV à travers la membrane bactérienne externe est possible grâce à une protéine de la superfamille des sécrétines, PilQ. Ces protéines, les sécrétines, forment un complexe stable de plusieurs sous-unités créant un canal d'environ 5 à 10 nm (Thanassi and Hultgren 2000). L'implication du pilus de type IV dans la virulence chez *P. aeruginosa* est reliée à ses fonctions d'adhérence et de mobilité qui seront critiques dans la colonisation de l'hôte.

Le pilus de type *fimbriae*, également appelé Cup (*Chaperone Usher Pathway*), est assemblé par la voie *Chaperone Usher Pathway*. Trois systèmes Cup sont identifiés chez *P.*

aeruginosa : CupA, CupB et CupC. Ces facteurs d'attachement sont nécessaires pour l'adhérence aux surfaces inertes telles que le verre ou encore le plastique. Cette capacité d'adhérence aux surfaces abiotiques a été démontrée comme étant directement impliquée dans la capacité de formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (Vallet et al. 2001).

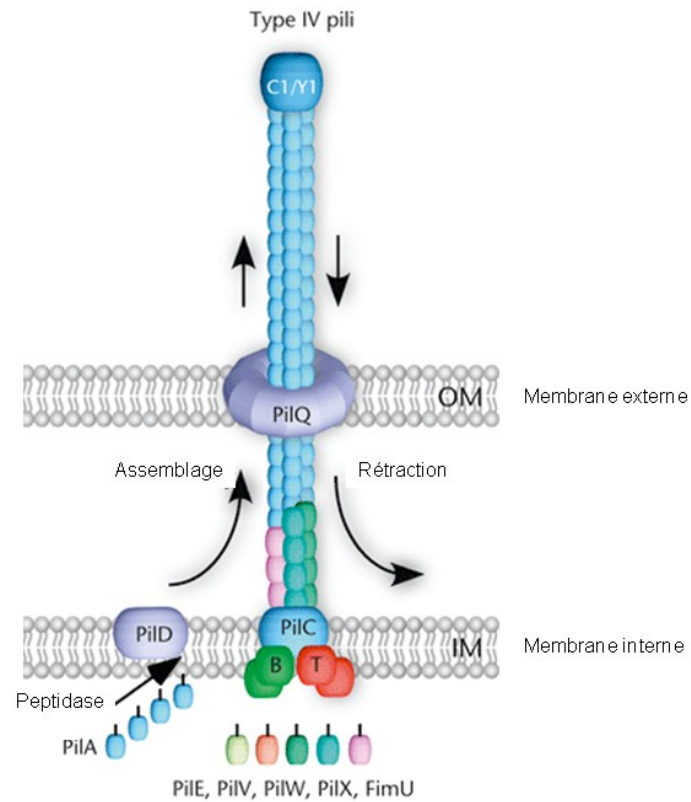


Figure 1.4 Pilus de type IV

La prépiline (précurseur de PilA) est clivée par PilD du côté cytoplasmique de la membrane interne. Les sous-unités minoritaires (PilE, PilV, PilW, PilX et FimU) participent à l'assemblage du filament du pilus. PilC et PilB fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage. PilQ permet le passage du pilus à travers la membrane externe et PilT (avec l'aide de PilU) permet sa rétraction. Adapté de I-Hsiu Huang, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas, United State of America (Huang, Dwivedi and Ton-That 2010).

1.2.2 Facteurs de virulence sécrétés

1.2.2.1 Enzymes protéolytiques

Quatre enzymes protéolytiques bien connues sont retrouvées chez *P. aeruginosa* : l'élastaseA (LasA), l'élastaseB (LasB), la protéase IV et la protéase alcaline (PA) (Baumann et al. 1993; Engel et al. 1998; Morihara et al. 1965; Peters and Galloway 1990). Ces exoprotéases dégradent les protéines et sont connues pour interférer avec le système immunitaire de l'hôte. Plus récemment, deux nouvelles enzymes ont été identifiées comme jouant un rôle important dans la virulence chez *P. aeruginosa* : la *Large Exoprotease* (LepA) (Kida et al. 2008) et la *P. aeruginosa Small Protease* (PASP) (Tang et al. 2009).

Les élastases LasA et LasB ont un effet destructif sur le tissu pulmonaire. En effet, la contraction et le relâchement du tissu pulmonaire sont dus à l'élasticité conférée par l'élastine, composante majeure du tissu. Agissant en synergie, LasA et LasB dégradent l'élastine. LasA a pour fonction de couper l'élastine et la rendre plus accessible pour la dégradation par d'autres enzymes protéolytiques telles que LasB, PA ou encore l'élastase des neutrophiles (Galloway 1991). En plus de sa fonction protéolytique, LasB est en mesure de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en inactivant les anticorps IgA et IgG et les composantes du complément (Heck et al. 1990; Hong and Ghebrehwet 1992).

La protéase IV est une sérine protéase qui agit en coupant l'extrémité carboxylée des résidus lysines. Elle est responsable de la dégradation du fibrinogène, de la plasmine, du plasminogène et de l'épithélium cornéen (Engel et al. 1998).

La PA est la seule exoprotéase à être sécrétée par le système de sécrétion de type I. Il s'agit d'une métalloprotéase qui dégrade différentes composantes du système immunitaire de l'hôte. Le complément et les cytokines pro-inflammatoires sont principalement ciblés (Avidano et al. 1998; Hong and Ghebrehwet 1992).

LepA est une protéase identifiée par Kida et coll. en 2008 qui a pour fonction l'activation de NF- κ B. En effet, LepA, tout comme la thrombine et la trypsine, active NF-

κB par activation des PARs (*Protease-Activated Receptor*) humains impliqués dans la réponse immune et inflammatoire. Également, il a été démontré que LepA induit la production d'IL-8 dans les cellules épithéliales pulmonaires (bronchioles) (Kida et al. 2008).

La PASP est une nouvelle protéine identifiée aux environs de 2005 chez *P. aeruginosa*. Cette protéine sécrétée caractérisée comme étant une protéase de 18,5 kDa serait impliquée dans l'érosion de l'épithélium cornéen. La séquence du gène codant pour la PASP est conservée à 99,5 % chez PAO1 et PA14 et des homologues de séquences (80 à 86 %) ont été retrouvés chez d'autres microorganismes. L'analyse de séquences a permis d'identifier une région N-terminale possédant une séquence signal destinée à être clivée avant la sécrétion de la protéase, ce qui suggère que PASP utiliserait le système de sécrétion de type II (Marquart et al. 2005)

1.2.2.2 Enzymes lipolytiques

Trois enzymes composent les enzymes lipolytiques chez *P. aeruginosa* : la lipase (LipA), l'estérase (EstA) et la phospholipase C. Tous ces enzymes hydrolysent des substrats lipidiques différents. Cependant, les lipases sont en mesure d'hydrolyser les substrats des estérases alors que l'inverse n'est pas possible (Wilhelm, Tommassen and Jaeger 1999).

Les lipases sont des carboxylestérases hydrolysant les acides gras à longues chaînes d'acylglycérols (Stuer, Jaeger and Winkler 1986). Elles hydrolysent les carboxyles des longues chaînes d'acides gras insolubles et, *in vitro*, mènent à l'hydrolyse de la majorité des surfactants pulmonaires lipidiques (Jaeger 1994). Leur rôle dans la pathogénie de *P. aeruginosa* a bien été établi (Berto et al. 1999) et il a été démontré qu'elles utilisent le système de sécrétion de type II (Stuer et al. 1986).

L'estérase se trouve attachée à la membrane externe chez *P. aeruginosa*. Son activité permet l'hydrolyse des palmitoyl-CoA (Ohkawa, Shiga and Kageyama 1979). Il a été

démonstré en 1999 que l'estérase EstA sécrétée par *P. aeruginosa* est excrétée par le système de sécrétion de type IV (Wilhelm et al. 1999) et qu'elle possède des fonctions physiologiques associées à la virulence. En effet, bien que ces fonctions ne soient pas très bien connues, une étude réalisée par Wilhelm et coll. publiée en 2007 a permis d'associer l'EstA à la mobilité de *P. aeruginosa* (*swarming*, *swimming* et *twitching*) et à la synthèse des rhamnolipides (glycolipides extracellulaires possédant un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire) (Wilhelm et al. 2007).

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles (Kiewitz and Tummler 2000). Chez *P. aeruginosa*, trois phospholipases C (PLC) ont été identifiées : la PLC non-hémolytique (PlcN), la PLC hémolytique (PlcH) et la PLC bêta (PlcB) (Hogan and Kolter 2002; Ostroff, Vasil and Vasil 1990; Ostroff and Vasil 1987; Stonehouse et al. 2002). PlcN hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylsérine (PS) alors que PlcH est une enzyme multifonctionnelle en mesure d'hydrolyser la PC, la sphingomyéline (SM) et possède une activité SM synthétase (Luberto et al. 2003). L'activité synergique des PlcN et PlcH contribue à la virulence de *P. aeruginosa* (Marquis, Doshi and Portnoy 1995; Smith et al. 1995). La production de PlcH par *P. aeruginosa* induit le recrutement d'IL-8 à l'épithélium alvéolaire pulmonaire en plus de jouer un rôle important dans le processus inflammatoire caractéristique des infections pulmonaires chez les patients FK en induisant la production d'eicosanoïdes par les macrophages et neutrophiles (Meyers and Berk 1990). La troisième phospholipase, PlcB, est impliquée dans la mobilité bactérienne et plus spécifiquement dans la mobilité de type *twitching* chez *P. aeruginosa*. Elle hydrolyse la phosphatidyléthanolamine (PE) et la PC (Barker et al. 2004).

1.2.2.3 Toxines

P. aeruginosa compte cinq différentes toxines jouant chacune un rôle dans la virulence de la bactérie. Une exotoxine (exotoxine A) et quatre exoenzymes (exoenzymes S, T, Y et U) sont produites lors d'une infection à *P. aeruginosa*.

Au prorata de son poids, l'exotoxine A est le composé le plus toxique sécrété par *P. aeruginosa* (Iglewski and Sadoff 1979; Liu 1974). Elle fait partie de la famille des enzymes mono-ADP-ribosyltransférases. Plus précisément, l'exotoxine A possède une activité NAD⁺-diphthamide ADP-ribosyltransférase (Domenighini and Rappuoli 1996). Elle est sécrétée sous forme inactive et est reconnue par le LRP (*LDL (Low-Density Lipoprotein) Receptor-Related Protein*) (Herz et al. 1990) qui induit le clivage protéolytique du domaine catalytique et son internalisation dans la cellule hôte où la toxine catalyse l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation 2 eucaryotique (eEF-2) affectant la synthèse protéique de l'hôte (Iglewski and Kabat 1975; Wick, Hamood and Iglewski 1990).

Les quatre exoenzymes (Exoenzyme S, T, U et Y), également appelées cytotoxines, sont produites par *P. aeruginosa* et sont sécrétées par le système de sécrétion de type III (SSTT) (Berthelot et al. 2003). La présence de ce système de sécrétion et de ses protéines effectrices est associée à une virulence accrue de la souche. La **figure 1.5** schématise ces protéines effectrices associées au SSTT et leur mécanisme d'action très général. Les exoenzymes S et T (ExoS et ExoT) sont toutes deux des protéines bifonctionnelles ayant une activité enzymatique provoquant un changement de morphologie des cellules affectées (Barbieri and Sun 2004). Elles possèdent une région N-terminale qui comprend un domaine RhoGAP ayant une activité GAP (*GTPase Activating Protein*) perturbant le cytosquelette d'actine et inhibant l'internalisation bactérienne dans les cellules épithéliales et les macrophages (Engel and Balachandran 2009; Hall and Nobes 2000; Krall et al. 2002). La région C-terminale d'ExoS et ExoT possède une activité catalytique d'ADP-ribosylation des protéines de la famille RAS (*Retrovirus-Associated DNA Sequences*) dépendante de la protéine FAS (Facteur activant l'exoenzyme S) (Henriksson et al. 2002). L'exoenzyme U (ExoU) possède une activité phospholipase A2. Cette lipase est en mesure de dégrader les composantes des membranes cytoplasmique et interne entraînant une mort cellulaire (Sato et al. 2003; Vallis et al. 1999). ExoU module la réponse inflammatoire de l'hôte (Sitkiewicz, Stockbauer and Musser 2007) en activant plusieurs facteurs de transcription responsables du contrôle de la réponse proliférative et de la production de cytokines pro-inflammatoires (McMorran et al. 2003). Cette exoenzyme possède également une activité lipolytique envers le dipalmitoyl-phosphatidylcholine, principal surfactant

pulmonaire, contribuant ainsi à la dissémination de l'infection pulmonaire vers une infection systémique (Allewelt et al. 2000). Finalement, l'exoenzyme Y (ExoY) est une adénylate cyclase responsable d'un changement de morphologie cellulaire tout comme ExoS et ExoT. Cependant, dans le cas d'ExoY, l'induction de ce changement morphologique est due à la translocation de la cytotoxine dans les cellules provoquant une augmentation d'AMPc intracellulaire (Vallis et al. 1999).

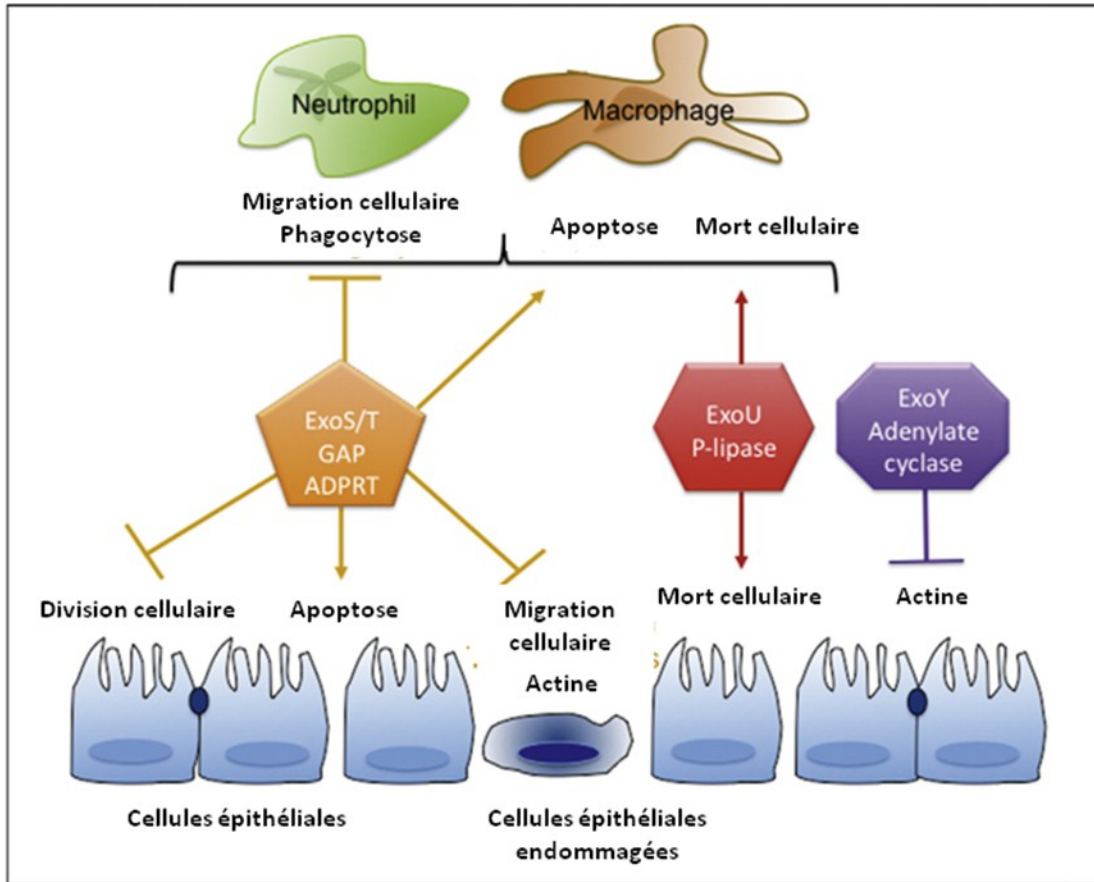


Figure 1.5 Protéines effectrices du SSTT de *P. aeruginosa* et leurs effets sur les fonctions des cellules hôtes

Tel qu'indiqué sur le schéma, ExoS possède une activité apoptotique, inhibe la migration cellulaire et perturbe le cytosquelette d'actine. ExoT inhibe la division et migration cellulaire, perturbe l'adhésion et induit la mort cellulaire. ExoS et ExoT inhibent tous deux la phagocytose et les fonctions des macrophages et neutrophiles. ExoU possède une activité phospholipase A2 qui mène rapidement à la mort de plusieurs types cellulaires. Finalement, ExoY est une adénylate cyclase qui perturbe les filaments d'actine. Agissant ensemble, ces quatre effecteurs du SSTT inhibent efficacement la réponse immune de l'hôte, perturbent la réparation des dommages tissulaires et favorisent la colonisation de l'hôte par *P. aeruginosa*. Adapté de Joanne Engel et Priya Balachandran, Microbial Pathogenesis and Host Defense Program, San Francisco, United States of America (Engel and Balachandran 2009).

1.2.2.4 Les chromophores

Les bactéries sont en mesure de capter leurs nutriments à partir des ressources disponibles chez l'hôte qu'elles infectent. En effet, ses sources de carbones organiques, d'azotes, de phosphates et de sels sont facilement accessibles dans les liquides et tissus du corps humain. Contrairement à ces nutriments faciles d'accès, le fer, indispensable à la survie bactérienne, n'est pas librement disponible dans le corps humain. La concentration de fer disponible en environnement aérobie (FeIII) est beaucoup trop faible pour être suffisante au développement des microorganismes. Le succès de l'établissement de l'infection par un pathogène repose donc, en partie, sur sa capacité à acquérir le fer par divers mécanismes spécifiques (Ratledge and Dover 2000). Les transferrines, les ferritines, l'hémoglobine et d'autres protéines sont des sources de fer potentielles pour le microorganisme qui devra combattre les défenses naturelles de l'hôte tandis que ce dernier devra entreprendre un mode de rétention de fer en réponse à l'infection (Payne 1993). Ce mécanisme de l'hôte génère des dérivés de l'oxygène réactif dans le but d'éradiquer le pathogène (Miller and Britigan 1997).

Dans un environnement pauvre en fer, plusieurs microorganismes pathogènes produisent des molécules capables de capter et transporter le fer. Ces molécules sont les sidérophores. D'autres bactéries, quant à elles, interagissent directement avec les protéines de l'hôte. Le pouvoir de liaison des sidérophores au fer est assez puissant pour permettre de capter le fer de molécules telles que les ferritines (Ratledge and Dover 2000). Chez *P. aeruginosa*, deux sidérophores sont sécrétés et associés à la virulence de la souche chez l'humain et l'animal : la pyoverdine et la pyocholine (Meyer et al. 1996; Takase et al. 2000). La pyoverdine ayant capté du fer (ferripyoverdine) agit comme autorégulateur transcriptionnel positif et module l'expression de divers gènes associés à la virulence, notamment en ce qui concerne les gènes responsables de la production des protéases IV et de l'exotoxine A (Lamont et al. 2002). La ferripyocholine catalyse la production de radicaux hydroxyles nocifs pour les cellules. Ces radicaux sont générés à partir des radicaux libres d'oxygène produits par les neutrophiles activés et sont très dommageables pour les tissus pulmonaires dans un contexte d'infection à *P. aeruginosa* chez une personne FK (Coffman et al. 1990).

La pyocyanine est un chromophore sécrété par *P. aeruginosa*. En milieu aérobie, ce dérivé de phénazine est impliqué dans le cycle d'oxydoréduction et génère le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La pyocyanine est très toxique pour les cellules et induit une dysfonction des cellules épithéliales nasales chez les patients FK. Il a également été démontré que ce chromophore possède une activité inhibant les inhibiteurs de protéase au site infectieux protégeant alors les protéases de *P. aeruginosa* connues pour leur implication dans la virulence de la bactérie (Ratledge and Dover 2000).

1.2.3 Système de régulation de l'expression des facteurs de virulence et sécrétion des protéines extracellulaires

Une machinerie complexe et bien organisée permet à *P. aeruginosa* de contrôler et de sécréter ses différents facteurs de virulence. En étroite liaison avec le stade de développement du microorganisme, son état (biofilm ou planctonique) et les conditions environnementales, les différents facteurs de virulence sont exprimés, synthétisés et sécrétés. Le système de sécrétion à deux composantes et le QS sont les deux principaux systèmes de régulation des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*. Cinq systèmes de sécrétion sont connus et permettent l'export de protéines extracellulaires permettant la colonisation de l'hôte.

1.2.3.1 Système de sécrétion à deux composantes

Les systèmes de sécrétion à deux composantes sont des systèmes fonctionnant en deux temps : un signal environnemental est détecté par une protéine qui le communique à une autre protéine par transfert de phosphates. Tout d'abord, la détection du signal environnemental est assurée par une protéine histidine kinase, également appelée senseur, qui constitue le module transmetteur. Par la suite, le module receveur, une phosphotransférase, assure la transduction du signal suite à sa phosphorylation par la protéine histidine kinase. Ce système constitue le système à deux composantes le plus simple. Chez *P.aeruginosa*, plus d'une cinquantaine de protéines sont en mesure d'occuper la fonction de senseur et près de 90 sont recensées comme étant des régulateurs de la réponse. Cette diversité permet un large éventail de systèmes à deux composantes et est associée à la

grande capacité d'adaptation aux changements environnementaux que subit la bactérie (Rodrigue et al. 2000).

1.2.3.2 Quorum Sensing

Le QS est un système de régulation permettant une forme de communication interbactérienne menant à une coordination de leur comportement. Ainsi, la population bactérienne est organisée et peut fonctionner comme un organisme multicellulaire, ce qui présente un avantage majeur pour la pathogénicité et l'adaptation chez *P. aeruginosa* (Parsek and Greenberg 2000).

Le QS est dépendant de la densité bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion de phéromones appelées des N-acyl-homosérine lactones (AHL). Ces AHL sont synthétisées par un gène inducteur codant pour une AHL-synthétase. Plus il y a de cellules, plus la concentration d'AHL augmente. Lorsque la concentration d'AHL atteint un niveau précis, celles-ci se lient à des régulateurs transcriptionnels responsables de l'activation des gènes de virulence. Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été identifiés : LasR/LasI et RhlR/RhlI. Dans les deux systèmes, le régulateur de type R (LasR et RhlR) est complexé avec les AHL et, en plus d'activer les gènes de virulence, active le gène I (LasI et RhlI) du système correspondant (Latifi et al. 1996). L'expression des gènes LasR et RhlR est modulée positivement par le système à deux composantes GacS/GacA et par Vfr (*Virulence Factor Regulator*), un activateur transcriptionnel AMPc dépendant (Ledgham et al. 2003). La **figure 1.6** schématise les interactions positives et négatives entre les différents gènes impliqués dans les systèmes LasR/LasI et RhlR/RhlI.

Un troisième régulateur transcriptionnel homologue de LasR et RhlR est connu pour être impliqué dans la modulation négative de la synthèse de certains facteurs de virulence : QscR (*Quorum Sensing Controlled Repressor*) (Chugani et al. 2001). Son activité module négativement les systèmes LasR/LasI et RhlR/RhlI en interagissant avec les régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR. À la différence des deux autres systèmes connus, QscR ne possède pas d'auto-inducteur, mais, tout comme LasR et RhlR, sa synthèse est modulée positivement par le système GacS/GacA (Ledgham et al. 2003).

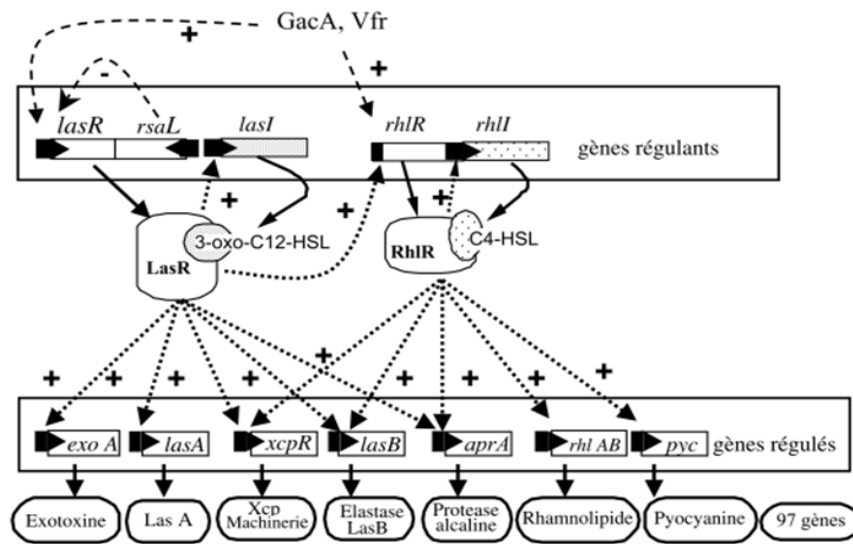


Figure 1.6 Mécanismes moléculaires du QS chez *P. aeruginosa*

Deux systèmes de QS ont été identifiés chez *P. aeruginosa* : le système LasR/LasI et RhIR/RhII. Le système est constitué d'un gène régulateur *lasR* codant pour la protéine LasR, d'un gène *lasI* codant pour une synthase auto-inductrice LasI participant à la synthèse d'une petite molécule de la famille des homosérines lactones (HSL) 3-oxo-C12-HSL. Le complexe LasR/3-oxo-C12-HSL agit en tant qu'activateur transcriptionnel des gènes de virulence (gènes régulés sur la figure) et de *lasI*. Selon le même modèle, le système RhIR/RhII est constitué de gènes *rhIR*, *rhII* et d'une autre HSL : C4-HSL. Le système RhIR est sous le contrôle du système LasR qui est lui même contrôlé négativement par le produit du gène *rsaL* et positivement par GacA et Vfr. (R. Ruimy 2004).

1.2.3.3 Systèmes de sécrétion des facteurs de virulence

Les facteurs de virulence associés à la colonisation bactérienne sont généralement des protéines extracellulaires et elles doivent donc franchir les deux membranes bactériennes imperméables aux composés hydrophiles. C'est donc en réponse à ce besoin que les bactéries à Gram négatif ont développé des mécanismes de transport des protéines. Cinq systèmes sont retrouvés chez *P. aeruginosa* : T1SS, T2SS, T3SS, TSS5 (T5aSS, T5bSS) et T6SS (Bleves et al. 2010). Deux types de transport regroupent les cinq systèmes. La sécrétion, définie comme le transport actif des protéines à travers les membranes bactériennes, et la translocation, référant au passage des protéines à travers la membrane cytoplasmique eucaryotique, constituent les deux types de transport (Goure et al. 2005).

1.3 Organisation et structure du génome de *Pseudomonas aeruginosa*

La grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* à différents environnements est une propriété qui lui est propre et particulière. La polyvalence métabolique de la souche lui permet de s'établir aussi bien dans un environnement tel que le sol ou l'eau, que chez les plantes, les insectes ou encore chez l'humain, où elle est responsable d'infections aiguës et chroniques. Cette remarquable capacité d'adaptation permettant à *P. aeruginosa* de passer d'organisme ubiquitaire à pathogène opportuniste lui vient de son génome large et complexe. Contrairement à d'autres bactéries à large génome, celui de *P. aeruginosa* n'est pas le résultat d'événements de duplication, mais bien d'un grand nombre de gènes présumés codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion, la mobilité, l'exportation de molécules (facteurs de virulence, antibiotiques) et la réponse aux signaux environnants par le système de sécrétion à deux composantes (Kung, Ozer and Hauser 2010; Stover et al. 2000). La séquence complète de *P. aeruginosa* PAO1, une souche originellement isolée d'une plaie infectieuse (Holloway 1955) mais maintenant largement utilisée comme souche de référence en laboratoire, a permis d'approfondir les connaissances scientifiques sur le rôle du microorganisme en tant que pathogène, de même que d'établir des relations entre la taille de son génome, sa complexité génétique et sa polyvalence écologique. Avec un

génomique de 6,3Mpb (Millions de paires de bases), PAO1 était le plus large des génomes bactériens séquencés à ce moment (Blattner et al. 1997; Cole et al. 1998; Kaneko et al. 1996; Kunst et al. 1997; Stover et al. 2000). Les 5 570 cadres de lecture ouverts du génome de *P. aeruginosa* PAO1 approchent la complexité génétique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme eucaryote simple possédant un génome codant pour 6 200 protéines (Ball et al. 2000).

Le génome des différentes souches de *P. aeruginosa* est composé d'une grande région conservée appelé 'core genome' variant de 89% à 98% du génome total (Ernst et al. 2003; Wolfgang et al. 2003) et de gènes accessoires supplémentaires. Des études génomiques comparatives entre diverses souches ont révélé un génome mosaïque chez certaines souches de *P. aeruginosa*, impliquant la présence de régions hautement conservées intercalées de matériels génétiques accessoires (Lee et al. 2006; Mathee et al. 2008; Roy et al. 2010; Winstanley et al. 2009). Le *core genome* est défini comme étant l'ensemble de régions génétiques présentes et hautement conservées dans toutes les souches de *P. aeruginosa*, indépendamment de leur provenance (environnementale, clinique, laboratoire) (Wolfgang et al. 2003). À l'inverse, les gènes accessoires supplémentaires sont des régions génomiques retrouvées spécifiquement dans une souche et absentes dans une autre. Ces régions associées à des éléments génétiques mobiles ont été acquises lors d'événements de transferts horizontaux.

Un nombre de caractéristiques propres aux régions génomiques accessoires permettent leur identification à l'intérieur du génome total de *P. aeruginosa*. En effet, le contenu en G+C de ces régions diffère de celui rencontré normalement dans le génome de la bactérie et peut ainsi permettre de cibler les régions potentiellement accessoires. *P. aeruginosa* possède un contenu caractéristique en G+C particulièrement élevé (66.6%) contrairement aux gènes acquis des autres genres qui ont, de façon générale, un contenu en G+C beaucoup moins élevé (Ernst et al. 2003). De plus, les éléments génétiques mobiles possédant souvent des régions génomiques mosaïques, sont fréquemment associés à des éléments facilitant la mobilité (Klockgether et al. 2004). Cependant, cette caractéristique ne peut être utilisée avec une grande certitude puisque ces éléments génétiques de mobilisation

sont souvent dégénérés ou perdus en raison du grand nombre de délétions et de réarrangements génomiques dans ces régions. Une dernière caractéristique permettant le repérage des gènes accessoires est la détection des *hotspots*, c'est-à-dire des loci précis dans le *core genome* qui sont des sites d'insertion privilégiés pour les gènes transférés. Les régions génomiques associées aux gènes d'ARNt (ARN-transfert) sont fréquemment des cibles génétiques pour les éléments génétiques mobiles (Mathee et al. 2008; Williams 2002).

1.3.1 Composantes majeures du génome accessoire de *P. aeruginosa*

Deux types regroupant la majorité des éléments associés aux régions accessoires du génome de *P. aeruginosa* sont distingués : les îlots génomiques non phagiques (*genomic islands* ou GIs) et les prophages. Les GIs regroupent les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs (*integratives and conjugatives elements*)), les îlots de remplacements et les séquences d'insertion (IS (*insertion sequence*)) et transposons (Tn).

1.3.1.1 ICEs

Les ICEs sont des insertions assez fréquentes chez *P. aeruginosa*. Ce sont des éléments génétiques autotransmissibles s'intégrant au chromosome bactérien seulement si au moins un site *attB* (*recombination site on bacterial chromosome*) est présent et reconnu par l'intégrase ICE dans la cellule réceptrice (Burrus et al. 2002; Burrus and Waldor 2004). Chez différentes souches de *P. aeruginosa*, plusieurs ICEs ont été identifiées, chacune possédant des tailles variant entre 81 et 108 kilobases (kb) et partageant 72 cadres de lecture ouverts avec une identité de séquence à plus de 75% (Klockgether et al. 2004; Klockgether et al. 2007; Wurdemann and Tummler 2007)

1.3.1.2 Îlots de remplacement

Ce groupe d'éléments génétiques mobiles est, tout comme les ICEs, associé à un transfert génétique horizontal. Cependant, à la différence de ces derniers, les îlots de remplacement sont présents chez pratiquement toutes les souches de *P. aeruginosa* et occupent sensiblement le même site d'insertion. Le terme îlots de remplacement a été établi

par Smith et coll. en 2005 (Smith et al. 2005) en référence aux ensembles de gènes associés à la biosynthèse de O-antigène, à la production de pyoverdine et de piline ainsi qu'à la glycolisation de la flagelline. La conservation de ces îlots dans la population bactérienne est probablement due à la pression sélective intense à échapper au système immunitaire de l'hôte.

1.3.1.3 IS et Tn

Les éléments transposables sont des entités ayant la capacité d'effectuer leur propre transposition (Bennett 2004). Ces régions génétiques contiennent des gènes encodant une transposase ayant une activité permettant la transposition par liaison à des séquences répétées inversées (IR (*Inverted Repeat*)). Les IS forment des séquences IR terminales permettant à la transposase encodée par les IS d'effectuer la transposition de la région génomique. Les transposons sont des complexes génétiques ayant des structures génomiques plus élaborées et comprenant, eux aussi, des courtes séquences IR et une transposase, mais également un ensemble de gènes supplémentaires codant généralement pour une résistance aux antibiotiques (Burland et al. 1998; Coyne, Courvalin and Galimand 2010; Dubois et al. 2002; Naas et al. 2008)

1.3.1.4 Prophages

Les bactériophages sont constitués d'une capsidie contenant de l'ADN ou ARN simple ou double brin. Un nombre minimal de gènes essentiels encodés par les bactériophages leur permet de parasiter les bactéries et d'utiliser leur machinerie répliquative. Deux types de phages sont connus : lytique (virulent) et lysogénique (tempéré). Les bactériophages lytiques, suite à l'infection, lysent la cellule hôte qu'ils infectent. C'est pour cette raison qu'ils sont dits virulents en contraste avec les bactériophages en phase lysogénique qui sont en mode de croissance non lytique, c'est-à-dire qu'ils vont intégrer le génome de la bactérie parasitée à des sites de recombinaison précis sur son chromosome. C'est lorsque le bactériophage est intégré au chromosome bactérien qu'il porte le nom de prophage. Des événements de recombinaison et diverses mutations sont responsables de la

détérioration des séquences d'insertion et permettent aux prophages de devenir permanents dans le génome de la bactérie hôte. Cette intégration des phages au génome bactérien confère à la bactérie de nouveaux phénotypes tels que la production de toxines procurant au microorganisme un avantage en comparaison à la souche n'ayant pas cette acquisition. Des événements de transduction sont à l'origine du transfert horizontal de facteurs de virulence et de certains gènes de résistance aux antibiotiques particulièrement profitables à la souche.

Plus de soixante phages lysogènes associés à *P. aeruginosa* ont été identifiés et peuvent être classés dans trois familles distinctes : *Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Podoviridae* (Akhverdian et al. 1984; Holloway, Egan and Monk 1960; Winstanley et al. 2009). En plus de conférer un avantage en termes de virulence et de pathogénie, les prophages sont en mesure de provoquer des modifications significatives dans les phénotypes et comportements de *P. aeruginosa*. Par exemple, chez la souche *P. aeruginosa* PAO1 arborant le phage D3, une augmentation de la capacité d'adhérence du microorganisme aux cellules épithéliales buccales humaines a été démontrée (Vaca-Pacheco et al. 1999). Une autre étude sur *P. aeruginosa* PAO1 possédant le phage Pf4 a démontré que l'activité du phage était associée à l'émergence d'une population bactérienne formant des *small-colony variants* (SCVs) (Webb, Lau and Kjelleberg 2004).

Les techniques d'analyse étant moins élaborées jusqu'à récemment, les diverses études réalisées se limitaient aux typages épidémiologiques. Plus récemment, les techniques de séquençage à haut débit ont permis le séquençage de génome bactérien entier. C'est le cas notamment pour la souche *P. aeruginosa* LESB58 dont le séquençage a révélé un génome contenant cinq GIs (LESGIs) (**figure 1.7**) et six prophages (LESPPs) dérivés d'un ou plusieurs des phages *P. aeruginosa* F10, D3112, D3 et Pfl (**figure 1.8**) (Winstanley et al. 2009). Bien que l'implication de ces régions dans la pathogénie et la virulence soit démontrée, les mécanismes précis par lesquels ces acquisitions génomiques permettent une augmentation de la virulence bactérienne ne sont pas bien connus à ce jour.

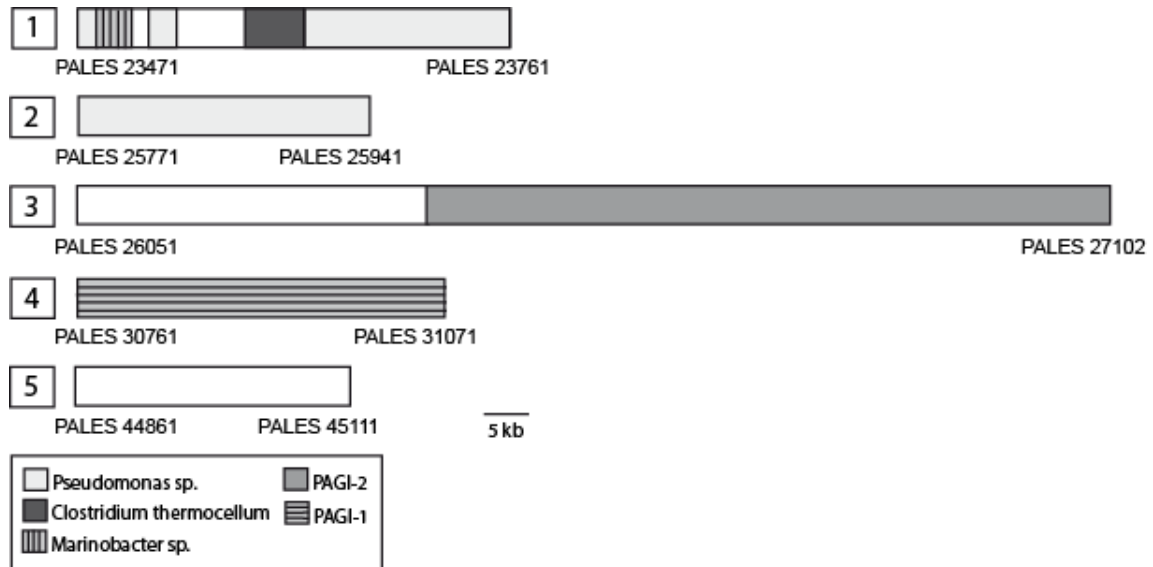


Figure 1.7 Ilots génomiques (GIs) identifiés chez *P. aeruginosa* LESB58

La légende au bas de la figure montre les similarités avec les différents îlots retrouvés chez d'autres *P. aeruginosa* et d'autres espèces. Adapté de Craig Winstanley et coll., 2009 (Winstanley et al. 2009).

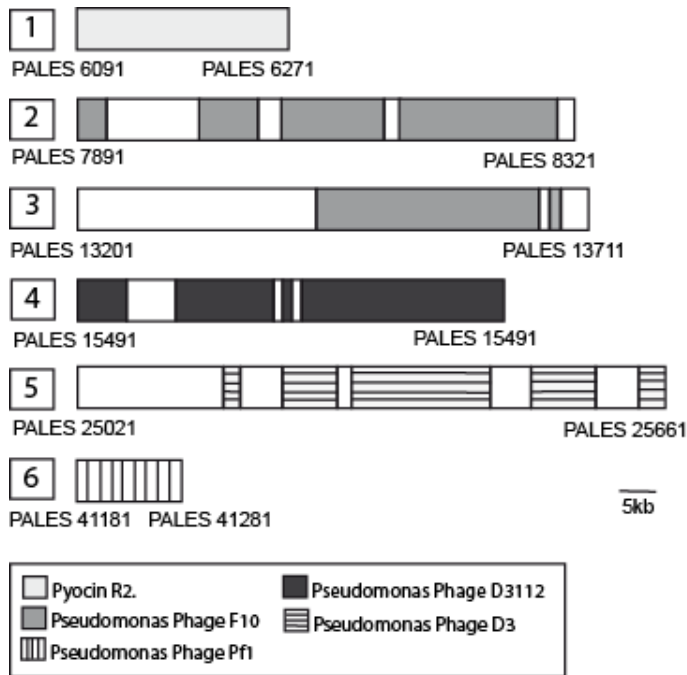


Figure 1.8 Prophages (PPs) identifiés chez *P. aeruginosa* LESB58

La légende au bas de la figure montre l'identification et la similarité des régions avec les phages de *P. aeruginosa*. Adapté de Craig Winstanley et coll., 2009 (Winstanley et al. 2009).

1.3.2 Mutagenèse transpositionnelle à étiquettes spécifiques

La mutagenèse transpositionnelle à étiquettes spécifiques (*signature-tagged mutagenesis* (STM)) est une méthode bien définie (Hensel et al. 1995) permettant d'identifier les gènes bactériens spécifiques requis pour l'établissement et le maintien de l'infection *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat en ce qui concerne la présente étude. Cette méthode est divisée en deux étapes majeures : la construction d'une librairie de mutants portant une étiquette spécifique et un criblage *in vivo* de la librairie. Des transposons munis d'une séquence étiquette spécifique bien définie sont utilisés afin de créer une banque de mutants. Le criblage des mutants se fait ensuite par PCR reconnaissant ces séquences étiquettes (Lehoux, Sanschagrin and Levesque 1999). Les bibliothèques construites sont divisées en deux : une aliquote d'un mélange de mutants de la collection est utilisée pour l'analyse *in vitro* et une autre aliquote de ce même mélange est utilisée pour l'analyse *in vivo*. Sept jours post-infection les poumons sont prélevés et la comparaison des PCRs *in vitro* et *in vivo* permet d'identifier les mutants incapables de s'établir ou de se maintenir dans le modèle *in vivo*. Ces mutants absents après le passage *in vivo* sont donc considérés comme étant atténués en virulence et sont retenus pour des analyses subséquentes. Les **figures 1.9, 1.10** schématisent, de façon simplifiée, les STMs des souches *P. aeruginosa* PAO1 et LESB58 respectivement.

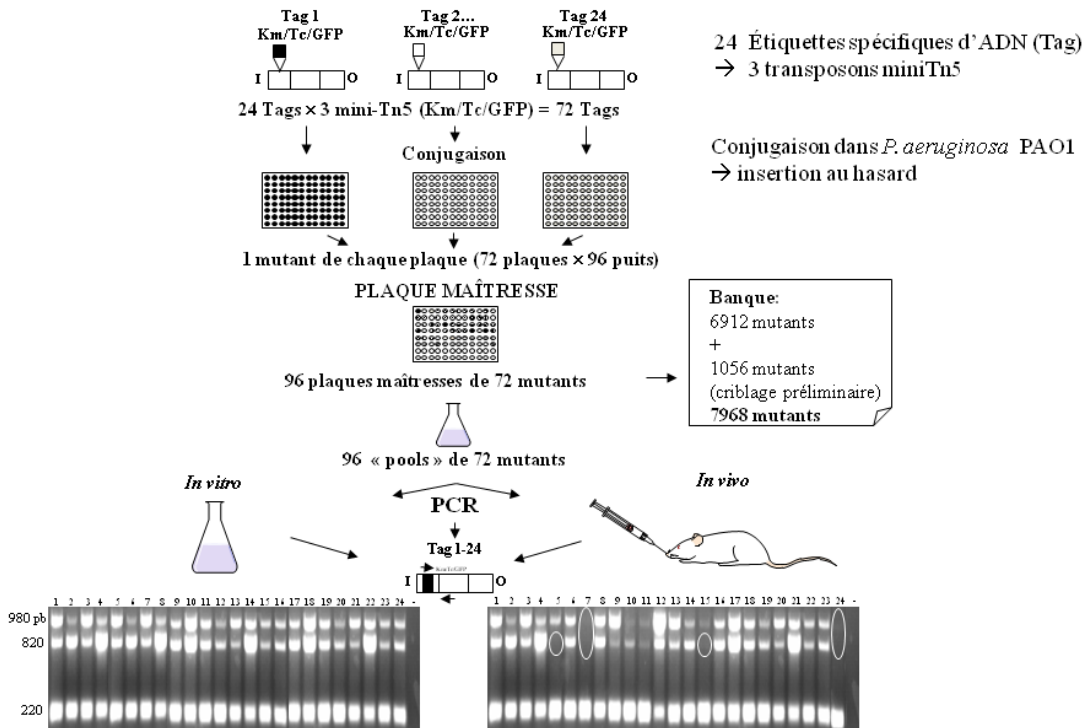


Figure 1.9 Représentation schématique de la STM chez *P. aeruginosa* PAO1

Trois transposons mini-Tn5 portent respectivement un marqueur kanamycine (Km), tetracycline (Tc) et GFP et chacun d'eux possède 24 étiquettes spécifiques différentes pour un total de 72 étiquettes spécifiques uniques et identifiables par PCR. Une librairie de 96 mutants ayant une insertion unique pour chacune des étiquettes est réalisée puis un *pool* contenant un mutant de chacune des librairies est fait. Ce *pool* servira à l'analyse *in vitro* et *in vivo*. Sur la figure, les cercles sur le gel d'agarose du *pool in vivo* démontrent l'absence des étiquettes détectables comparativement au *pool in vitro*. Cette absence de détection se traduit par l'incapacité du mutant portant cette étiquette à établir ou maintenir l'infection chez l'animal. Ces mutants seront utilisés pour des analyses subséquentes. Les bandes se trouvant à 980 paires de bases (pb), 820pb et 220pb correspondent respectivement au mini-Tn5 Tc, GFP et Km. Adapté de Lehoux et coll., 2002 (Lehoux, Sanschagrin and Levesque 2002).

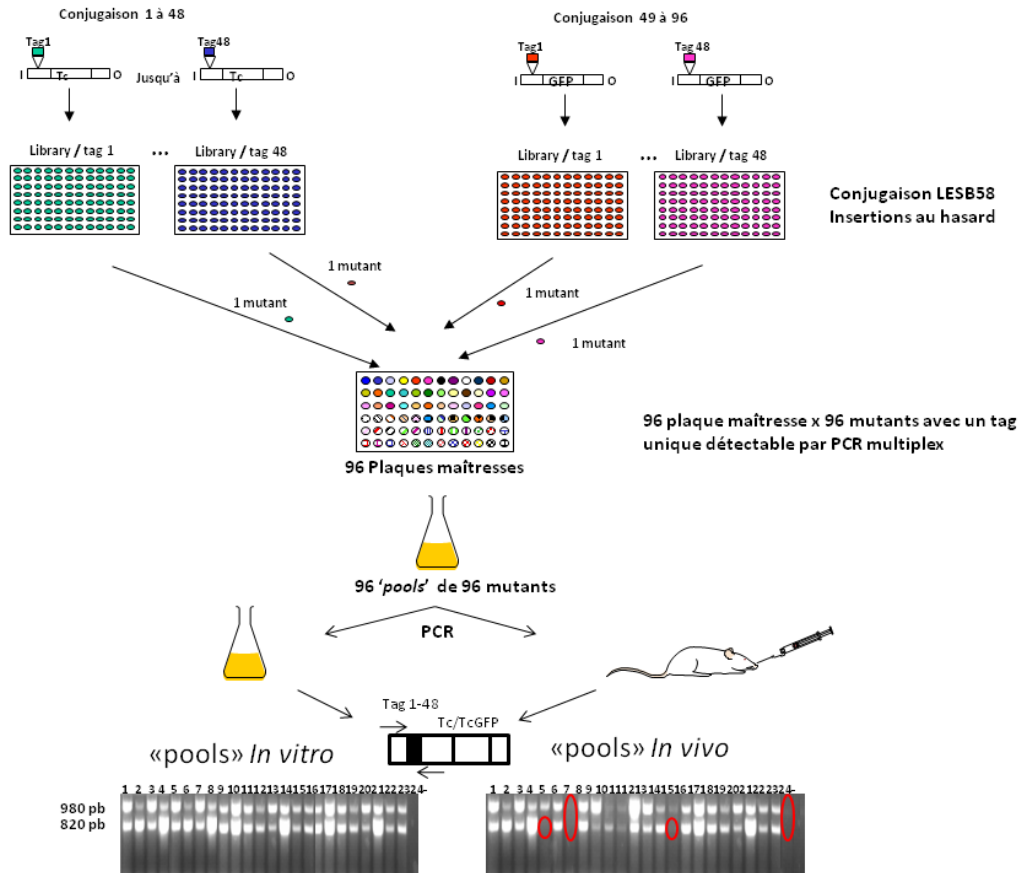


Figure 1.10 Représentation schématique de la STM chez *P. aeruginosa* LESB58

Deux mini-Tn5 portant un marqueur Tc ou TcGFP ont été utilisés. Chacun d'eux (Tc ou TcGFP) possède 48 étiquettes à identification unique, soit un total disponible de 96 étiquettes uniques et identifiables par PCR. Une librairie de 96 mutants ayant une insertion unique pour chacune des étiquettes est réalisée puis un *pool* contenant un mutant de chacune des librairies est fait. Ce *pool* servira à l'analyse *in vitro* et *in vivo*. Sur la figure, les cercles sur le gel d'agarose du *pool in vivo* démontrent l'absence des étiquettes détectables comparativement au *pool in vitro*. Cette absence de détection se traduit par l'incapacité du mutant portant cette étiquette à établir ou maintenir l'infection chez l'animal. Ces mutants seront utilisés pour des analyses subséquentes. Les bandes se trouvant à 980pb et 820pb correspondent respectivement au mini-Tn5 Tc et mini-Tn5 TcGFP. Adapté de Sanschagrín et coll., 2008 (Sanschagrín, Kukavica-Ibrulj and Levesque 2008).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa* LES (Liverpool Epidemic Strain)

La souche épidémique *P. aeruginosa* LES a été identifiée pour la première fois en 1996 dans une unité d'enfants atteints de FK au centre hospitalier Alder Hey à Liverpool au Royaume-Uni (Cheng et al. 1996). Cette souche émergente a la particularité d'être particulièrement agressive comparativement aux souches de *P. aeruginosa* les plus fréquemment rencontrées. En effet, la souche LES est associée à un haut taux de morbidité (Al-Aloul et al. 2004), à une multi-résistance aux antibiotiques et à une meilleure capacité d'adaptation que les souches précédemment étudiées telles que PAO1 et PA14 (Salunkhe et al. 2005). En plus de ses traits agressifs, LES possède une grande facilité de transmission. En sus des cas de transmission entre les patients FK, des cas de transmission de patients FK infectés à des parents non FK ont également été rapportés. Ce type de transmission d'infection à *P. aeruginosa* entre patients FK et personnes saines ne s'était jamais rencontré jusqu'ici et demeure particulièrement inhabituel pour une infection causée par un pathogène opportuniste. La presque totalité des infections à *P. aeruginosa* était, jusqu'à l'identification de LES, acquise individuellement de l'environnement (Cheng et al. 1996; McCallum et al. 2002). Le premier isolat de LES (LESB58) a été entièrement séquencé et annoté (Winstanley et al. 2009). Suite à l'identification de LES, plusieurs autres souches épidémiques ont été rapportées en Australie (Armstrong et al. 2003; O'Carroll et al. 2004), et dans d'autres états du Royaume-Uni (Lewis et al. 2005; Scott and Pitt 2004). À ce jour, quatre isolats LES sont connus : LESB58 (Winstanley et al. 2009), LESB65 (Fothergill et al. 2007), LES400 et LES431 (Salunkhe et al. 2005). En comparaison avec le génome de LESB58, les quatre souches ont été testées pour la présence des régions génomiques accessoires par PCR (Carter et al. 2010) et il a été démontré que les quatre souches possèdent les îlots de pathogénie GI-1, GI-3 et GI-5 (**figure 1.7**) et les prophages 3, 4 et 6 (**figure 1.8**). Seule la souche LES431 ne possède pas le prophage 2 et LESB65 le prophage 5. LESB58 est le seul isolat à posséder GI-4. Suite à la STM effectuée chez LESB58 (**figure 1.11**), un indice de compétition a été réalisé *in vivo* chez le rat. Les résultats démontrent que les mutants des prophages 2 et 5 sont incapables de maintenir l'infection et que les mutants du prophage 3 et de l'îlot de pathogénie GI-5 ont beaucoup de difficulté à se maintenir dans le poumon (Winstanley et al. 2009). L'importance des phages

lysogéniques chez *P. aeruginosa* est très mal comprise mais, suite à une autre étude réalisée en 2010, il est évident que les PPs 2 et 3 chez LESB58 sont impliqués dans l'établissement de l'infection chronique chez le modèle animal (McGannon, Fuller and Weiss 2010). La production de particules phagiques a été étudiée par Fothergill et coll. (Fothergill et al. 2011) et suggère que les prophages contiennent des gènes activés uniquement lors du processus d'induction par différents antibiotiques. De plus, la quantité de phages produite semble être directement liée avec l'antibiotique utilisé, ce qui suggère l'importance capitale du choix de l'antibiotique utilisé pour traiter les patients FK ayant une infection pulmonaire à *P.aeruginosa* puisque ce choix peut avoir un effet dramatique sur le taux de phages libres produit dans le poumon.

1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa* LESB58

LESB58 est le premier isolat de la souche LES à avoir été identifié en 1988, mais ce n'est qu'en 1996 que la première étude sur la souche a été publiée (Cheng et al. 1996). La séquence complète ainsi que l'annotation de LESB58 sont disponibles sur le site de *Pseudomonas Genome Database* (www.pseudomonas.com). Les cinq GIs et les six PPs de LESB58 (**figure 1.7 et 1.8**) sont bien connus mais peu compris. La disponibilité de l'information comparativement aux autres isolats LES en font un bon modèle pour étudier la souche. LESB58 est le modèle bactérien utilisé dans la présente étude.

LESB58 est reconnue pour son hypervirulence, tout comme les autres isolats LES. En effet, de par son agressivité, sa forte capacité de transmission et sa multi-résistance aux antibiotiques, LESB58 est problématique chez les personnes FK et leurs parents. Le séquençage et l'annotation de la souche modèle LESB58 (Winstanley et al. 2009) ont révélé un génome de 6,7Mpb comprenant plus de 450 gènes formant les GIs et PPs et a permis d'identifier 263 des 265 séquences codantes de facteurs de virulence présentent chez *P. aeruginosa* PAO1 (Wolfgang et al. 2003). La STM (**figure 1.10**) effectuée chez LESB58 a permis d'approfondir les analyses de virulence de la souche et de cibler des gènes potentiellement impliqués dans sa pathogénie.

Des analyses *in vivo* chez le rat ont démontré que LESB58 persistait dans les bronchioles lors de l'infection pulmonaire chronique alors que les souches de référence en

laboratoire PAO1 et PA14 se dispersaient dans les régions pulmonaires alvéolaires. La **figure 1.11** montre les coupes histologiques de poumons de rats sept jours post-infection avec PAO1, PA14 et LESB58. De plus, des analyses phénotypiques effectuées sur LESB58 ont démontré une mobilité réduite en comparaison avec les autres souches. En effet, autant pour les mobilités de type *swimming* que *twitching*, LESB58 présente un phénotype défectueux lorsque comparé aux souches de routine utilisées en laboratoire. Un autre phénotype particulier à LESB58 est l'hyperproduction du biofilm. Bien que la souche possède une courbe de croissance beaucoup plus lente en milieu minimal, elle produit une quantité de biofilm significativement supérieure à PAO1 et PA14 (Kukavica-Ibrulj et al. 2008).

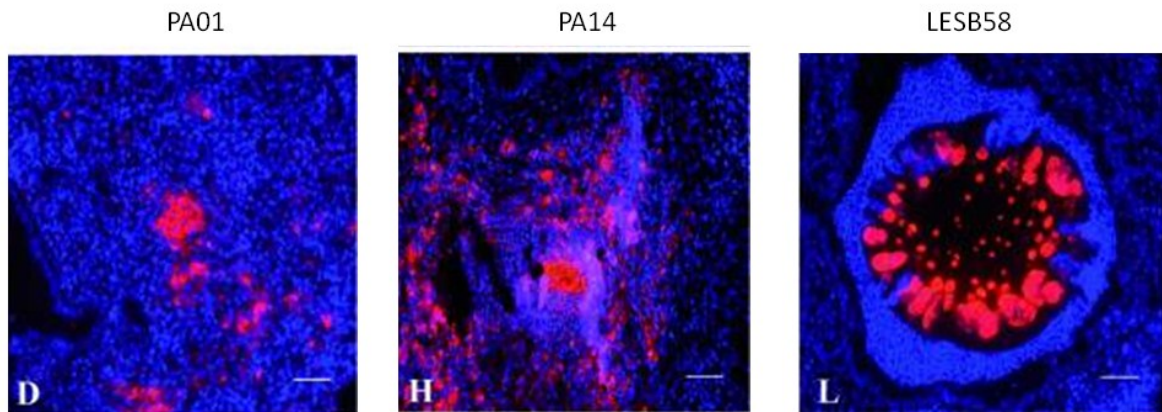


Figure 1.11 Localisation et persistance des souches *P. aeruginosa* PAO1, PA14 et LESB58 dans les poumons de rat sept jours post-infection.

Les trois images de la figure représentent chacune une coupe histologique de la même section d'un poumon de rat sept jours post-infection avec les souches PAO1 (D), PA14 (H) et LESB58 (L). La coloration au DAPI (4',6' – diamidino-2-phénylindole dihydrochloride) permet de visualiser le tissu pulmonaire (en bleu sur la figure) et une immunofluorescence indirecte permet de visualiser les bactéries (en rouge). Le trait blanc en bas à gauche des images représente une longueur de 50 μ m. On peut voir qu'il y a persistance de LESB58 dans les bronchioles alors que les souches PAO1 et PA14 se dispersent dans les tissus alvéolaires. Adapté de Kukavica-Ibrulj et coll., 2008 (Kukavica-Ibrulj et al. 2008)

1.5 Mise en situation du projet de recherche

1.5.1 Problématique

L'augmentation du nombre de bactéries résistantes en milieu hospitalier est un problème bien connu et de plus en plus préoccupant en raison des difficultés à le contrer. *P. aeruginosa* ne fait pas exception à cette problématique puisque la bactérie possède une multi-résistance aux antibiotiques. La souche *P. aeruginosa* LESB58 est particulièrement mise d'avant sur cet aspect. En effet, la souche épidémiologique pose de grandes difficultés de traitement chez les patients FK. La forte agressivité de LESB58 et son étonnante capacité de transmission entre les patients FK et aux parents de ces derniers (Cheng et al. 1996; Salunkhe et al. 2005) suscitent l'intérêt des chercheurs et nous amènent à élaborer des stratégies d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin de développer de nouveaux antimicrobiens efficaces.

Actuellement, avec les avancées technologiques en génomique, transcriptomique et protéomique, de nombreuses études sont orientées vers la connaissance fonctionnelle de la bactérie. Il s'agit d'identifier et de comprendre l'impact sur le génome qu'ont les gènes bactériens associés à la virulence et qui sont impliqués dans l'établissement et le maintien de *P. aeruginosa* dans le cadre d'une infection pulmonaire chronique chez les patients atteints de FK.

1.5.2 Hypothèse et objectifs

P. aeruginosa est une menace pour tous les patients immunodéprimés ou atteints de FK. L'émergence de nouvelles souches hypervirulentes de *P. aeruginosa* conduit à des difficultés de traitement encore plus prononcées et à une transmission élargie. De fait, la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques s'impose. Le séquençage et l'annotation des souches *P. aeruginosa* PAO1, PA14 et LESB58 ont permis d'identifier des régions génomiques uniques à LESB58, une souche émergente caractérisée par son hypervirulence et sa multi-résistance. Le comportement *in vivo* de LESB58 ainsi que ses

phénotypes particuliers (hyperproducteur du biofilm, QS précoce mais croissance lente en milieu minimal) sont des aspects importants dans la compréhension de la pathogénie. Nous suggérons que les gènes supplémentaires associés aux régions génomiques uniques à *P. aeruginosa* LESB58 (GIs et PPs) sont impliqués dans la pathogénie et l'hypervirulence de la souche. La détermination et la caractérisation de ces gènes essentiels pour l'établissement et le maintien de l'infection *in vivo* pourraient éventuellement permettre de repérer des cibles thérapeutiques potentielles pour le développement de nouveaux antimicrobiens.

La vérification de cette hypothèse a été réalisée par le biais de l'objectif général suivant : identifier et caractériser des gènes essentiels à l'établissement et au maintien de l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* LESB58 dans un modèle animal (le rat) et de faire la caractérisation moléculaire fine d'un gène impliqué dans la pathogénie de la bactérie.

Trois volets composaient l'objectif général. Dans un premier temps, une analyse globale du génome a été réalisée afin de déterminer les gènes candidats pour le projet. D'une banque de 9216 mutants portant l'insertion d'un transposon, 162 ont été retenus en raison de leur caractère atténué *in vivo*. De ces 162 mutants, 11 possédaient une insertion dans une région génomique unique chez LESB58. Suite aux études bio-informatiques et aux études *in vivo*, notre choix s'est arrêté sur deux mutants possédant une insertion dans un gène atténuant sa virulence. Nous avons par la suite testé le niveau d'expression des gènes des mutants correspondants en comparaison avec le niveau d'expression des gènes de la souche sauvage. L'intérêt était de savoir si un effet polaire dû à l'insertion du transposon pouvait biaiser les analyses et si le gène muté était transcrit. Un deuxième volet de l'objectif général était d'évaluer le rôle des gènes choisis dans l'établissement et le maintien de la bactérie *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. Pour ce faire, des indices de compétition ont permis de déterminer le niveau d'atténuation de la virulence du mutant en comparaison avec la souche sauvage. Le modèle principal sur lequel nous avons analysé nos résultats est le rat mais des tests sur l'amibe et la drosophile ont également été réalisés. Finalement, un troisième volet était de faire une

étude comparative des transcriptomes complets de la souche sauvage et de la souche mutante. Ce type d'analyse a permis de mieux comprendre l'implication fonctionnelle d'un gène sur l'ensemble du génome et ainsi d'évaluer et de cibler les gènes impliqués dans la pathogénie.

Les résultats de ces trois objectifs sont présentés sous forme d'article (chapitre 2) et une conclusion générale incluant une analyse critique des résultats est discutée à la fin du présent mémoire.

Chapitre 2

Génomique fonctionnelle des gènes essentiels à l'infection pulmonaire chronique et uniques chez la souche épidémique *Pseudomonas aeruginosa* LESB58

Ce deuxième chapitre est présenté sous forme d'article scientifique et traite des méthodes et résultats obtenus lors de mon projet de maîtrise qui portait sur l'implication des régions génomiques accessoires uniques à *P. aeruginosa* LESB58 dans la virulence et la pathogénie de la souche. Plus précisément, l'article présenté porte sur l'identification de 11 mutants portant un transposon chez la souche *P. aeruginosa* LESB58 possédant une insertion dans un îlot génomique ou un prophage et la caractérisation génomique plus poussée de deux de ces mutants.

Cet article sera soumis au journal scientifique *PLoS Pathogens* et les auteurs de cet article sont : **Andrée-Ann Lemieux**, Irena Kukavica-Ibrulj, Brian Boyle, Joanne L. Fothergill, Geneviève Filion, Valérie Dekimpe, Craig Winstanley, Steve J. Charette, Eric Déziel et Roger C. Levesque.

Ma contribution à cette publication se situe sur le plan technique et scientifique. J'ai participé aux clonages, séquençages, analyses bioinformatiques et analyses de virulence *in vivo* et *in vitro* des 11 souches STM possédant une insertion dans un élément génétique mobile dans l'intérêt de confirmer leur identification dans le génome de LESB58 et de cibler les gènes accessoires impliqués dans l'établissement et le maintien de la virulence de *P. aeruginosa* LESB58. J'ai également participé aux analyses génomiques en effectuant la préparation des échantillons et en appliquant les techniques de qPCR. J'ai participé à l'analyse des résultats obtenus dans le but de déterminer l'impact du transposon. De plus, j'ai préparé les échantillons bactériens pour les analyses de transcriptomique en optimisant la méthode suggérée par le fabricant et j'ai participé à l'analyse des résultats obtenus par

alignement des transcrits sur le génome de référence et par compilation et synthèse des données générées par Jérôme Laroche (analyse statistique) et Brian Boyle (plateforme de séquençage). La production de phages a été testée par Dre Joanne L. Fothergill du groupe du Dr Craig Winstanley. Les données nous ont été fournies pour compléter nos analyses de virulence. Les analyses chez l'amibe ont été réalisées par le groupe du Dr Steve Charette et ceux chez la drosophile par le Dr Eric Déziel. Tout le travail a été effectué sous la direction du Dr Roger C Levesque.

2.1 Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique (FK). La souche épidémique LESB58 (*Liverpool Epidemic Strain B58*) est associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité des patients. En effet, LESB58 est hautement résistante aux antibiotiques et possède une grande capacité de transmission. Le séquençage et l'annotation du génome de LESB58 ont permis d'identifier des régions génétiques mobiles uniques à LESB58. 455 gènes additionnels encodant cinq îlots génomiques (GIs) et six prophages (PPs) ont été rapportés suite à la comparaison du génome de LESB58 et de PAO1. Une mutagenèse à étiquette signature (STM) du génome de LESB58 a été réalisée donnant accès à une collection de 9216 mutants qui ont été criblés *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. 162 de ces mutants se sont avérés incapables d'établir ou de maintenir l'infection. Onze mutants STM possédaient une insertion dans un GI ou un PP. La perte de virulence a été évaluée chez ces 11 mutants par des indices de compétition (CI) réalisés chez le rat qui ont permis de confirmer une diminution de virulence variant de 3 à 71 fois en comparaison avec LESB58 sauvage. Neuf des 11 mutants ont également démontré une perte de virulence chez l'amibe. Des études additionnelles ont été réalisées sur deux mutants sélectionnés dans le cadre de la présente étude : un mutant portant une insertion dans une protéine de réplication du prophage 2 (DnaC) et un second portant l'insertion dans une protéine portale putative du prophage 3. Aucune différence de phénotype n'a été observée chez ces deux mutants en comparaison avec LESB58 sauvage. Des études transcriptionnelles effectuées par qPCR ont démontré

qu'aucune différence d'expression n'était visible entre le mutant et la souche sauvage pour le gène portant l'insertion et les gènes avoisinants. L'analyse comparative du transcriptome complet entre le mutant *dnaC* et LESB58 sauvage a révélé une forte augmentation des gènes de traduction, modification post-traductionnelle et de dégradation du génome conservé chez le mutant, ainsi qu'une surexpression des gènes reliés aux chaperones, au métabolisme énergétique et aux *heat shock proteins*. La production de phages spontanée chez les deux mutants analysés a été observée et montre une diminution importante lorsque comparée avec LESB58 sauvage. L'incapacité de ces deux mutants à établir ou maintenir l'infection pulmonaire chez le rat et la réduction de la production spontanée de phage en sus des résultats de transcriptomique suggèrent fortement l'implication de ces PPs dans l'hypervirulence de LESB58.

Genes from Prophage Islands of the Accessory Genome of the *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 Epidemic Strain are Essential for Chronic Pulmonary Infection

Andrée-Ann Lemieux¹, Irena Kukavica-Ibrulj¹, Brian Boyle¹, Joanne L. Fothergill², Geneviève Filion¹, Valérie Dekimpe³, Jérôme Laroche¹, Craig Winstanley², Steve J. Charette¹, Eric Déziel³ and Roger C. Levesque¹

1 Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada, **2** Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, **3** INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Abstract

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* causes persistent pulmonary infection in cystic fibrosis (CF) patients. The Liverpool Epidemic Strain (LES) *P. aeruginosa* LESB58 is highly resistant to antibiotics and is associated with high transmissibility causing increased morbidity and mortality. The LESB58 6.7 Mb genome contains 6 prophages (PPs) and 5 genomic islands (GI) encoding 455 additional genes compared to PAO1; with several implicated in chronic pulmonary infection. We constructed a PCR-based signature-tagged mutagenesis (PCR-STM) library of 9216 LESB58 mutants and several rounds of screening were performed in a rat model of chronic lung infection. After 7 days postinfection, 162 mutants with miniTn5Tc or miniTn5TcGFP were retained as defective for *in vivo* maintenance. We identified 11 STM mutants having insertions in genes found in GIs or in PPs. We evaluated attenuation of virulence for these mutants using the competitive index (CI) in the rat model of chronic lung infection. A defect in maintenance was confirmed by a reduction in CI values between 3- and 71-fold lower than for the wild-type. Additional *in vivo* screening was done in the amoeba *Dictyostelium discoideum* and confirmed that 9 of the 11 STM mutants with insertions in gene from GIs or PPs had diminished virulence. Additional studies focused on 2 STM mutants with both genes found in PPs 2 and 3, one defective in PALES_08021 encoding a

DNA replication protein DnaC, and in PALES_13521 encoding for a putative portal phage protein. Phenotypic analysis did not show differences between LESB58 and these two mutants. Transcriptional studies by qPCR confirmed absence of differential expression for insertional mutated genes and flanking genes. Whole transcriptome RNA-Seq profiling of the *dnaC* mutant identified up-regulated genes implicated in translation, post-translation modification and protein degradation, chaperones and heat shock proteins and in energy metabolism. Comparison of phage production between the wild-type strain and mutants showed reduced phage production in both mutants. Inabilities of these STM mutants to establish and maintain pulmonary infection in rat model combined with reduced amount of phage production strongly suggest their involvement in LESB58 hypervirulence.

Author summary

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous microorganism found in environment. It is an opportunistic pathogen responsible for nosocomial infections and persistent pulmonary diseases for immunosuppressive and Cystic Fibrosis patients. LESB58 is a hypervirulent epidemic strain of *P. aeruginosa* exhibiting unusual phenotypes and unique genome elements. This study's aim was to investigate the implication of the LESB58 accessory genome in the establishment and in maintenance of a chronic lung infection.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen which is responsible for pulmonary diseases in immunosuppressive and in CF patients (Stover et al. 2000). The widespread assumption that CF patients acquire only unique strains of *P. aeruginosa* from the environment was challenged when molecular typing was used to demonstrate the spread of a beta-lactam-resistant isolate, now known as the Liverpool Epidemic Strain. LES was first identified in a United Kingdom children's CF unit in 1996 (Cheng et al. 1996). LES isolates, including the first complete sequenced genome of a LES isolate LESB58 (Winstanley et al. 2009), exhibited an unusual phenotype characterized by early overexpression of the cell-density dependent quorum sensing (QS) regulon, including virulence secreted factors such as LasA, elastase and pyocyanin (Fothergill et al. 2007; Salunkhe et al. 2005). In addition, LESB58 is known to be a biofilm hyperproducer and has

reduced motility for twitching, swimming and swarming. Studies in animal models such as in the rat model of chronic lung infection confirmed *in vivo* growth as macrocolonies in the bronchial lumen when compared to PAO1 or PA14, which are spread in the lung tissue (Kukavica-Ibrulj et al. 2008). Moreover, LES is associated with greater patient morbidity and mortality than other *P. aeruginosa* strains (Al-Aloul et al. 2004). Cases of transmission between CF patients have been reported as mentioned above and confirmed by molecular typing. Unexpected cases of transmission between CF children and their parents have also been reported (McCallum et al. 2002).

Whole genome sequencing of LESB58 revealed a 90% highly conserved core genome and the presence of 455 supplementary genes unique to the strain. Six PPs and five GIs composed this accessory genome. Four of the six PPs are absent from the PAO1 strain and only two of the five GIs identified within the LES strain showed similarity to any previously identified *P. aeruginosa* GI (Winstanley et al. 2009). A previous study on LESB58 phage production indicated that five of the six PPs are able to produce active phage progeny (Winstanley et al. 2009). The role of PPs in virulence and in *in vivo* initiation and maintenance of infection remains poorly understood. Recently, we showed that PPs 2 and 3 have been involved in establishment of a chronic infection in the rat lung model (Fothergill et al. 2011; McGannon et al. 2010; Winstanley et al. 2009). To investigate the importance of genes implicated in *in vivo* maintenance and presumably those found in the accessory genome of LESB58, a PCR-STM was performed. As PCR-STM is based upon a negative selection, this technique identifies genes assumed to be essential *in vivo*. From the 9216 STM mutants obtained, 162 were defective for *in vivo* maintenance. The identification of genes inactivated by DNA sequencing and by bioinformatics analysis of these mutants identified 11 STM mutants having an insertion in PPs and GIs. Further analyses were done on these mutants and this study showed results obtained.

Results and discussion

Identification of LESB58 STM mutants defective for *in vivo* maintenance

A library of LESB58 Tn5 insertion mutants was constructed using pUTminiTn5*Tet* and pUTminiTn5*TetGFP* conjugated into LESB58 (see methods). A collection of 9216

STM mutants was assembled and consisted of 96 master plates each with 96 well microtiter plates. After 7 days postinfection in a rat model of chronic lung infection (Cash et al. 1979), lungs were screened by a PCR-based STM (Winstanley et al. 2009) and identified 162 mutants defective for *in vivo* maintenance. Mutants are listed in **Table S1**. DNA sequencing of genomic DNA flanking the cloned antibiotic resistance gene of the transposon and bioinformatics analysis confirmed the position of transposition insertion and the identity of each gene inactivated. Genes inactivated in these 162 STM mutants were classified into the 27 class/function categories of genes identified in *P. aeruginosa* strain PAO1 (www.pseudomonas.com). As shown in **Figure 1**, 23.1 % of mutants have an insertion in genes involved in transport of small molecules (12.7%) and membrane proteins (10.4%) related to a surface function.

Of major interest, 11 STM mutants defective for *in vivo* maintenance were found to have an insertion in a gene part of a GI or a PP. It is well known that GIs and PPs encode accessory genes to the pangenome in various human pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* and *P. aeruginosa* (Tims et al. 2010; Tormo-Mas et al. 2010; Winstanley et al. 2009). This additional genomic DNA may have a major role in spreading virulence genes among bacterial populations. In CF cases of *P. aeruginosa* infections where the ecological heterogeneity of the lung environment and therapeutic regimes are probable factors, a role for parasitic bacteriophage cannot be ruled out (Brockhurst, Colegrave and Rozen 2011). We hypothesize that genes crucial for *in vivo* maintenance may be part of this accessory genome in LESB58. In order to confirm this hypothesis, the 11 STM mutants having insertions in genes found in GI or PP were then selected for further analysis. **Table 1** presents these 11 STM mutants, their predicted function and their localisation in GIs or PPs. Most of them do not have any ortholog in PAO1 and all of them have a defect for *in vivo* maintenance in the rat model, confirming their involvement in establishment of a chronic lung infection. PPs and GIs are depicted in **Figure S1** showing the position of the 11 STM insertions. All transposon insertions carried by the 11 mutants were mapped into the corresponding gene and depicted within the operon and PP or GI. From the 11 STM mutants, 5 have an insertion in prophage 3, strongly suggesting its implication in pathogenicity and virulence. Implication of PPs 3 and 2 in pathogenicity have been proposed (Fothergill et al. 2011; McGannon et al. 2010) In addition, active

phages can be obtained containing the genome of 2 and 3 in CF sputum (Fothergill et al. 2011) supporting our hypothesis which proposes implication of PPs and GIs in hypervirulence of LESB58 in CF lung.

***In vivo* competitive index analysis (CI) of the GI and PP STM mutants**

To assess the degree of attenuation of virulence of the 11 STM mutants obtained, we performed an *in vivo* CI in the rat model of chronic lung infection. Equal ratio of each mutant strain was mixed in agar beads with wild-type strain to infect animal. After seven days post-infection, lungs were recovered and bacterial enumerations were done to determine the proportion of mutants that were absent and those that were present. CI for each mutant was calculated and results are represented in **Figure 2**. STM mutants having a CI value of less than 1 indicated a defect for *in vivo* virulence when in competition with the wild-type LESB58 strain. The CIs values of the STM mutants varied between 0,27 and 0,014, indicating a reduction of virulence ranging from 3- to -71 fold when compared to the wild-type strain. The growing curves of each mutant in competition with the wild-type strain *in vitro* in liquid medium were determined and showed no differences in CFUs (data not shown).

Multi-host *in vivo* screening of mutants

After confirmation of a diminution of *in vivo* maintenance in the rat model of chronic lung infection depicted in **Figure 2**, *in vivo* CIs were done using *Dictyostelium discoideum* and *Drosophila melanogaster* as hosts for the 11 STM mutants having insertion in PPs and GIs. Nine of the 11 STM mutants defective for *in vivo* maintenance in the rat model also showed attenuation in the amoeba model. Results are summarized in **Table 2**. Only one mutant was confirmed in the fly model (data not shown). As we are studying the biology for chronic infection in mammal and *in vivo* maintenance, fly pricking is ideal as this methods reflects more acute than chronic infection (Mulcahy et al. 2011). Moreover, previous studies using *D. melanogaster* identified mutants effective in metabolic pathways for amino acid, nucleotide biosynthesis and defects in central metabolism (Potvin et al. 2003). None of the 11 STM mutants screened in the rat lung have been identified with such

defects. However, 52 mutants of the 162 STM mutants collection have been confirmed in *D. discoideum*. The rat model of chronic lung infection is well-established for mammalian studies whereas the amoeba model seems to be an excellent complementary host (Cosson et al. 2002).

Characterization of STM/PALES_08021 and STM/PALES_13521

STM/PALES_08021 and STM/PALES_13521 were selected for further characterization. Schemes of the PPs and operons for both mutants are depicted in **Figure 3**. We selected STM/PALES_08021 because of its low CI value, having a 14 fold reduction in *in vivo* virulence compared to the wild-type strain (see **Figure 2**). The PALES_08021 gene has a predicted function implicated in DNA replication as an homolog of the DnaC protein (see **Table 1**). The insertion in STM STM/PALES_08021 causes reduced phage production as shown in **Figure 4**. As depicted in **Figure 3**, the *dnaC* gene harbours the insertion of the transposon in the middle of the operon. DnaC is indirectly implicated in the replication fork by forming a protein complex with DnaB, an essential helicase. DnaC is implicated in initiation of the replication fork complex and the absence of a functional protein may inhibit this initiation resulting in absence of replication. (Davey et al. 2002; Wahle, Lasken and Kornberg 1989; Wickner and Hurwitz 1975). Insertion in the replication protein of PP-2 clearly affect the amount of spontaneous phage produced when compared to the wild-type strain as shown in **Figure 4**.

STM/PALES_13521 has been selected according to its 0,27 CI value (see **Figure 2**), its known predicted function of putative portal protein (see **Table 1**), the STM insertion has a major impact on reduced phage production (see **Figure 4**) and its insertion location in prophage 3 (see **figure 3**). The portal protein plays a role in entry and exit of the DNA in the phage capsid. It interacts with the CLP protease ATP-dependant which is directly involved in degradation of misfolded proteins (Barkow et al. 2009; Kruger et al. 2000).

Analysis of typical *P. aeruginosa* LESB58 virulence factors including biofilm formation (O'Toole and Kolter 1998b), motility (Rashid and Kornberg 2000), heat shock, hydrogen peroxydase, hemolysin (Frees et al. 2003) and protease assays (Laux et al. 2002) were done but no differences were observed between both STM mutants and the LESB58 wild-type strain. Pyocyanin (Schaber et al. 2004) and pyoverdine (Potvin et al. 2003)

production were also assessed and no differences were observed. As we did not observe any phenotypic differences for typical virulence factors, but a strong defect for *in vivo* maintenance, we decided to perform gene expression analysis and transcriptomics profiling of both mutants in comparison with the wild-type strains.

qPCR

As insertion of a transposon may result in polar effect on flanking genes, we performed a qPCR for each gene of the operon for both mutants. As shown in **Figure 5**, no polar effect has been observed on upstream or downstream flanking genes, neither for STM/PALES_08021 nor STM/PALES_13521 mutants. We did not observe significant differential expression for the gene having the insertion for both mutants according to the Mann Whitney test performed with Prism GraphPad software. As no effect has been observed on gene having insertion and flanking gene, we performed a whole genome transcriptome profiling on the Roche 454 GS FLX Titanium.

Transcriptome profiling of STM/PALES_08021

We decided to focus on one of the two mutants for the transcriptomics analysis and we selected STM/PALES_08021 due to its smallest CI value of 0,074 and the impact of the insertion on reduced phage production. In addition, its localisation in PP2 was confirmed previously to be significant for *in vivo* maintenance of LESB58 (Fothergill et al. 2011; Winstanley et al. 2009). Furthermore, absence of differential expression from the gene harbouring the transposon compared to the wild-type strain was presumably indicative of an effect on other genes in other regions of the STM genome. We decided to perform a whole transcriptome profiling and identified genes which showed differences in levels of gene expression. Whole genome transcriptome profiling of STM/PALES_08021 revealed 135 up-regulated genes distributed in the 27 different *P. aeruginosa* gene classes and results are summarized in **Figure 6**. Most of the up-regulated genes (36,6%) are related to translation, post-translation modification and degradation function, and all are located in the core genome.

The PALES_08021 gene did not show differential expression when compared to the wild-type strain according to the tagwise dispersion statistical test, meaning that some level of transcription occurred despite the insertion of the transposon. Thus, we propose that the DnaC protein is probably truncated and has a defect in translation or post-translation modification. This hypothesis is supported by the level of 36,6% of up-regulated (see **Figure 6**) core genes related to translation, post-translation and modification function, when compared to the wild-type strain. These changes in levels of gene expression have an impact on the reduction of spontaneous phage production. Indeed, the truncated DnaC involved in DNA replication is presumably not functional resulting in inhibition of the prophage 2 replication forks and defect in phage 2 production. To confirm functional activity of DnaC, sequencing of the PALES_08021 gene in STM/PALES_08021 using a primer in the transposon and bioinformatics analysis demonstrated that the transposon is inserted at the end of the gene at nucleotide position 571 of the 788 nucleotides (www.pseudomonas.com). The *Tn5tet-gfp* do not encode a stop codon and its insertion at the end in addition to the transcriptome profiling and sequencing results of the gene supports the truncated protein hypothesis.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, media and culture conditions

P. aeruginosa LESB58, the earliest isolate of the LES strains has been described previously (Winstanley et al. 2009). Unless otherwise indicated, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* were grown in TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco). BHI (Brain-Heart Infusion) broth (Difco), LB (Luria Broth) or MHA (Muller-Hinton Agar) (EMD) have also been used for *P. aeruginosa* growth. When needed, these media were supplemented with 1,5% Bacto-agar (Difco), ampicilline (Ap; 100µg/ml for *E.coli* DH10B), Tetracycline (Tc; 10µg/ml for *E. Coli* DH10B or 45µg/ml for *P. aeruginosa* LESB58 STM mutants; Sigma-Aldrich). Cloning of chromosomal DNA was performed using the pTZ18R vector (GE Healthcare). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, T4 DNA polymerase were purchased from New England Biolabs and used in standard procedures (Sambrook 2001). HotStart TAQ DNA polymerase from Qiagen and Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity from Invitrogen were used according to the manufacturer instructions.

PCR-based signature-tagged mutagenesis of LESB58

PCR-based signature-tagged mutagenesis (PCR-STM) is a well defined method that has been used with *P. aeruginosa* PAO1 (Lehoux, Sanschagrín and Levesque 2001). In the present study, the PCR-based STM method was used with *P. aeruginosa* LESB58. As described in Winstanley et al. (Winstanley et al. 2009), conjugation was performed in order to transfer tagged mini-Tn5tet or miniTn5tetGfp into the recipient strain *P. aeruginosa* LESB58. Exconjugants were arrayed as libraries of 96 pools of 96 unique tagged mutants. The rat model of chronic lung infection was used for screening 9216 mutants *in vivo* (Sanschagrín et al. 2008). After seven days post-infection, rat lungs were collected and multiplex PCR analyses were performed comparing *in vitro* and *in vivo* PCR products that were absent or present in agarose gels. From the 9216 STM mutants, 162 were retained for further analyses due as a negative selection (absence in agarose gels after PCR screening). The identity of disrupted genes were determined by sequencing as described previously (Sanschagrín et al. 2008) and identities were confirmed by similarity searches with the *P. aeruginosa* genome database (www.pseudomonas.com).

Identification of the 162 STM mutants defective for *in vivo* maintenance

Genomic DNA from each STM mutant was prepared using DNeasy Blood and Tissue Kit from Qiagen. After an overnight culture at 37°C, OD₆₀₀ was noted and an aliquot of 2 x 10⁹ cells for each mutant was centrifuged for 10 minutes at 7500 rpm. Supernatants were removed and genomic DNA extractions were performed according to the instructions of the supplier. Genomic DNA was partially digested with *Pst*I, purified with Microcon-PCR and then cloned into the pTZ18R vector. Insertion of the construction in *E. coli* DH10B was done by electroporation. Mutants were sequenced as described previously (Sanschagrín et al. 2008) and identities were confirmed by similarity searches with the *P. aeruginosa* genome database (www.pseudomonas.com).

***In vitro* and *in vivo* competitive index (CIs)**

Agar beads were prepared according to a modification of a previously described method (Kukavica-Ibrulj et al. 2008). From overnight cultures of each LESB58 STM mutant and the wild-type strain, a fresh culture was grown until an $OD_{600} = 1$. Subsequent steps were the same as described by Kukavica-Ibrulj et al (Kukavica-Ibrulj et al. 2008). We used an equal ratio of LESB58 -LESB58 STM mutants by determining CFUs.

In vitro and *in vivo* CIs were done according to a modification of a previously described method (Kukavica-Ibrulj et al. 2008). Total number of *P. aeruginosa* CFUs was determined on MHA and MHA supplemented with Tc at 45 μ g per ml for mutants. CIs were calculated from the ratio of mutant to the wild-type CFUs recovered *in vivo* and adjusted by the input ratio. The final CI data were represented as the geometric means for animals in the same group. Each *in vivo* and *in vitro* competition was tested for statistical significance by Mann-Whitney test on GraphPrism Pro 5.0 software.

RNA extraction, cDNA synthesis and QPCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Midi Kit (Invitrogen) and according to the instructions of the supplier. cDNA was synthesized using 1 μ g of total RNA as template. cDNA synthesis was performed using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Quiagen) and Random Primers (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative RT-PCR (QPCR) was done according to the QPCR standard procedure for Roche Light Cycler to validate the expression level for selected genes. QPCR was performed on the Roche Light Cycler 480. Primers used are shown in Table 1. Statistical differential gene expression between the wild-type and STM mutants was assessed using Mann-Whitney test on GraphPad Prism 5.0 software.

mRNA isolation and transcriptome analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy Midi Kit (Invitrogen) and according to the instructions of the supplier. Depletion of rRNA and tRNA was performed using the RiboMinus Kit (Invitrogen) according to a modified version of the manufacturer's instructions. Magnetic beads were prepared following the supplier's instructions. The hybridization step was optimized for *P. aeruginosa* LESB58 as follows: 20 μ g of total

RNA (<20µl) were added to 400 pmol of RiboMinus probe and 100 µl of RiboMinus hybridization buffer and then denatured 3 minutes at 65°C before the hybridization step (5 minutes at 37°C). Samples were cooled down for 30 seconds on ice. Subsequent steps were the same as suggested by the instructions of the supplier. Total RNA quality and mRNA quality were assessed using Agilent RNA 6000 Pico Kit and the BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). cDNA synthesis was performed using the cDNA synthesis system from Roche and according to the instructions of the supplier. Oligo (dT) primers supplied with the kit were used. cDNA samples were sent to the genomic platform at the Institut de biologie integrative et des systems (IBIS, Université Laval, Québec, Canada) for the whole transcriptome sequencing on the Roche 454 GS FLX Titanium.

Whole transcriptome data analysis

Data obtained from the whole transcriptome sequencing was assembled and analysed with the Newbler software (Roche). All reads obtained were mapped on the *P. aeruginosa* LESB58 reference genome available on the *Pseudomonas* genome database (www.pseudomonas.com)

Statistical differential gene expression data analysis was done using the R BioConductor package edgeR (Robinson, McCarthy and Smyth 2010). The statistical analysis is based on the negative binomial distribution that takes into account the presence of over-dispersion across the samples. Three wild-type RNA-seq libraries were compared to one mutant library. Raw counts were directly used in the R package and normalization of the number of reads between samples was done with the quantile-adjusted method. Separate dispersions were estimate for individual tags (tagwise dispersion approach). The adjusted p-values according to the method of Benjamini and Hochberg (1995) (Klipper-Aurbach et al. 1995) were used to select differentially expressed genes ($p < 0,05$).

Spontaneous phage production

Cultures were grown to an OD of 0.5 (A_{600nm}) and phage induction was performed by adding antibiotics at the MIC (norfloxacin, 50 µg/ml; tobramycin, 4 µg/ml; colistin, 1 µg/ml; ceftazidime, 64 µg/ml; meropenem, 2 µg/ml; ciprofloxacin, 4 µg/ml) and incubating for 1 h followed by 1 h recovery in fresh media. Induced active phage particles were enumerated

using plaque assays, in which 100 μ l of culture supernatant was added to 100 μ l of 0.5 ($A_{600\text{nm}}$) *P. aeruginosa* PAO1 (the indicator strain) in 5 ml molten 0.4 % Luria agar and poured onto L-agar, in triplicate.

STM mutants screening in different host models

(i) Fly pricking assay with *Drosophila melanogaster*

Adult female flies aged of 7 ± 2 days were pricked according to a protocol modified from (Castonguay-Vanier et al. 2010). Bacterial cells were grown in TSB to an OD_{600} of 2.0 and diluted 10X in sterile 10 mM $MgSO_4$ supplemented with 100 μ g/mL ampicillin. The flies were anesthetised using CO_2 . Pricking was performed in the dorsal thorax using a small drop of the appropriate bacterial suspension with a 23S gauge Hamilton needle. For each strain to be tested, a total of 30 flies were infected. The flies were separated by groups of 10 in vials containing 5% sucrose and 1.5% agar. Ten control flies were pricked with a solution of 10 mM $MgSO_4$ supplemented with 100 μ g/mL ampicillin. The flies were kept at 25°C and 65% humidity. Fly survival was recorded daily and survival data was compiled and analyzed with the Kaplan-Maier survival curves using the GraphPrism Pro 5.0 software. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to assess significance between the survival curves.

(ii) Virulence assay with *Dictyostelium discoideum*

The LESB58 parental strain and the 12 STM mutants having insertions in GIs and PPs were inoculated from frozen glycerol stocks on LB agar medium and incubated at 37°C for 24h. The bacteria were then swabbed and resuspended in 300 μ L of LB broth. The resuspension was spread out on 1/5 diluted SM agar (final concentrations: 0.2 % of bactopectone [Oxoid, Nepean, Ontario, Canada], 0.02 % of yeast extract, 3.2mM of KH_2PO_4 , 0.81mM of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 11.1 mM of glucose and 2.0 % of bactoagar). The Petri dishes were dried before adding the amoeba.

D. discoideum DH1-10 cells were grown in a Petri dish at 21°C in HL5 liquid medium (1.43 % of bactopectone [Oxoid, Nepean, Ontario, Canada], 0.72 % of yeast extract, 50.0

mM of maltose monohydrate, 3.6 mM of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 3.6 mM of KH_2PO_4) with 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tetracycline (Cornillon et al. 2000; Mercanti et al. 2006). The amoebas were washed, harvested and resuspended in HL5 without tetracycline at a final concentration of 3000 cells per $5\mu\text{L}$. Subsequent serial dilutions were done for the following concentrations: 1000, 300, 100, 30, 10 and 0 cells per $5\mu\text{L}$. Bacterial lawns were spotted with droplets of $5\mu\text{L}$ of the amoeba dilutions. The droplets were dried and the Petri dishes were incubated at 23°C for five days. After this incubation period, Petri dishes were examined for the presence of phagocytic plaques (e.g. holes in bacterial lawns produced by amoeba growth). This experiment was performed four times.

Acknowledgments

R.C. Levesque is funded by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) in the genomics program, S. Charette is a research scholar from the FRSQ and E. Deziel is funded by CIHR. We thank people at the IBIS core facility for NGS sequencing and the IBIS bioinformatics group for genome assembly.

References

1. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
2. Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, et al. (1996) Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 348: 639-642.
3. Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I, Paradis-Bleau C, et al. (2009) Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19: 12-23.
4. Fothergill JL, Panagea S, Hart CA, Walshaw MJ, Pitt TL, et al. (2007) Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiol* 7: 45.
5. Salunkhe P, Smart CH, Morgan JA, Panagea S, Walshaw MJ, et al. (2005) A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J Bacteriol* 187: 4908-4920.
6. Kukavica-Ibrulj I, Bragonzi A, Paroni M, Winstanley C, Sanschagrin F, et al. (2008) In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J Bacteriol* 190: 2804-2813.
7. Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, et al. (2004) Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* 59: 334-336.
8. McCallum SJ, Gallagher MJ, Corkill JE, Hart CA, Ledson MJ, et al. (2002) Spread of an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain from a patient with cystic fibrosis (CF) to non-CF relatives. *Thorax* 57: 559-560.
9. McGannon CM, Fuller CA, Weiss AA (2010) Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3790-3798.
10. Fothergill JL, Mowat E, Walshaw MJ, Ledson MJ, James CE, et al. (2011) Effect of antibiotic treatment on bacteriophage production by a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 426-428.
11. Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG, Jr., Bass JA (1979) A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis* 119: 453-459.

12. Mulcahy H, Sibley CD, Surette MG, Lewenza S (2011) *Drosophila melanogaster* as an Animal Model for the Study of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections In Vivo. *PLoS Pathog* 7: e1002299.
13. Potvin E, Lehoux DE, Kukavica-Ibrulj I, Richard KL, Sanschagrín F, et al. (2003) In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* 5: 1294-1308.
14. Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, et al. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* 184: 3027-3033.
15. Wahle E, Lasken RS, Kornberg A (1989) The dnaB-dnaC replication protein complex of *Escherichia coli*. II. Role of the complex in mobilizing dnaB functions. *J Biol Chem* 264: 2469-2475.
16. Davey MJ, Fang L, McInerney P, Georgescu RE, O'Donnell M (2002) The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO J* 21: 3148-3159.
17. Wickner S, Hurwitz J (1975) Interaction of *Escherichia coli* dnaB and dnaC(D) gene products in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 921-925.
18. Barkow SR, Levchenko I, Baker TA, Sauer RT (2009) Polypeptide translocation by the AAA+ ClpXP protease machine. *Chem Biol* 16: 605-612.
19. Kruger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M (2000) The clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol* 182: 3259-3265.
20. O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
21. Rashid MH, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4885-4890.
22. Frees D, Qazi SN, Hill PJ, Ingmer H (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* 48: 1565-1578.
23. Laux DC, Corson JM, Givskov M, Hentzer M, Møller A, et al. (2002) Lysophosphatidic acid inhibition of the accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 alginate, pyoverdinin, elastase and LasA. *Microbiology* 148: 1709-1723.
24. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, et al. (2004) Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 53: 841-853.
25. Sambrook JR, D. W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd edn Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
26. Lehoux DE, Sanschagrín F, Levesque RC (2001) Discovering essential and infection-related genes. *Curr Opin Microbiol* 4: 515-519.
27. Sanschagrín F, Kukavica-Ibrulj I, Levesque RC (2008) Essential genes in the infection model of *Pseudomonas aeruginosa* PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Methods Mol Biol* 416: 61-82.

28. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140.
29. Klipper-Aurbach Y, Wasserman M, Braunspiegel-Weintrob N, Borstein D, Peleg S, et al. (1995) Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 45: 486-490.
30. Castonguay-Vanier J, Vial L, Tremblay J, Deziel E (2010) *Drosophila melanogaster* as a model host for the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One* 5: e11467.
31. Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, et al. (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* 275: 34287-34292.
32. Mercanti V, Charette SJ, Bennett N, Ryckewaert JJ, Letourneur F, et al. (2006) Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J Cell Sci* 119: 4079-4087.

Figure Legends

- Figure1. Distribution of the 162 STM mutants within the *P. aeruginosa* gene class functions.** The 162 STM mutants defective for *in vivo* maintenance have been distributed within the 27 *P. aeruginosa* gene class functions (www.pseudomonas.com).
- Figure2. *In vivo* competitive index of the 11 STM mutants having an insertion in PPs or GIs.** Mutants were grown in the rat lung in competition with the LESB58 wild type strain for 7 days. Each circle represents the survival ratio of the mutant/WT for a single animal. Geometric means of the CIs of all rats for a mutant is shown as a solid line and corresponds to the CI value indicates above the identified mutant on the x axis. $P < 0.05$ for all tested strains according to a Mann-Whitney test.
- Figure3. STM insertion in PPs 2 and 3 of STM/PALES_08021 and STM/PALES_13521 mutants.** Red arrows indicate an STM insertion in a PP or a gene. Enlarged regions show operons of the genes harbouring the STM insertion which is localized in the gene as depicted in scheme. Gene are represented as colored boxes according to their subcellular localization (indicates in the caption at the bottom of the figure). Color in the prophages indicates their similarities with other *Pseudomonas* phages (indicates in the caption at the bottom of the figure). All genes orientation is 5' → 3' as depicted in scheme.
- Figure4. LESB58 and STM mutants spontaneous phage production.** Spontaneous phage production of LESB58 was compared to some STM mutants defective for *in vivo* maintenance. Framed results show spontaneous phage production of the two mutants studied in this actual work compared to the wild type strain LESB58 (first bar in the figure). Kruskal-Wallis ANOVA test was performed

by comparing the phage production for each STM mutant to LESB58 (* $P < 0.05$).

Figure5. QPCR of STM/PALES-08021 and STM/PALES_13521 mutants. QPCR of gene harbouring the insertion and flanking genes have been done for both mutants compared to the wild type strain LESB58. *rspL* housekeeping gene was used as reference gene. We looked at the level of transcription of gene having the insertion before and after the transposon insertion, named as PALES_gene-1 and PALES-gene-2 respectively on the figure. **A.** Level of expression for gene in operon PALES_08011. **B.** Level of expression for genes in the operon PALES_13511. A Mann-Whitney test was performed and no results showed a significantly differential level of expression ($P < 0.01$)

Figure6. Comparative transcriptomics analysis of STM/PALES_08021 and wild-type strain LESB58. Whole transcriptome analysis was done for the PALES_08021 mutants and the wild-type strain LESB58. Differential expression of gene transcriptions was compared between the mutant and the wild-type strain according to the Edge R software. All results shown in the figure have a $P < 0.01$.

Figure S1. STM insertions in phage clusters and genomics islands of LESB58. Red arrows indicate an STM insertion in a PP or GI. Enlarged regions show operons of the genes harbouring the STM insertion. Gene are represented as colored boxes according to their subcellular localization (indicates in the caption at the bottom of the figure). Color in the phages or genomics islands scheme indicates their similarities with other *Pseudomonas* phages or pathogenicity islands (indicates in the caption at the bottom of the figure). All genes orientation is depicted in 5' → 3' orientation. Transcription orientation of operons is indicates by the black horizontal arrows under or above the boxes.

Tables

Table 1. Bioinformatics analysis of the 11 STM mutants having an insertion in GIs or PPs

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	PPs or GIs	PseudoCAP Function Class
STM/PALES_06181	PA0622	Probable bacteriophage protein	LES prophage 1	Related to phage, transposon, or plasmid
STM/PALES_08021	None	Hypothetical protein	LES prophage 2	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13261	None	Hypothetical protein	LES prophage 3	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13451	PA2804	Putative uncharacterized protein PflO1_0304	LES prophage 3	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13521	None	Putative portal protein, phage portal 2	LES prophage 3	Related to phage, transposon, or plasmid
STM/PALES_13541	None	Hypothetical protein	LES prophage 3	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_25621	None	Putative lytic enzyme	LES prophage 5	Membrane proteins
STM/PALES_30891	None	Hypothetical protein	LES GI-4	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_31041	PA2005	FadE36, possible aminoglycoside phosphotransferase	LES GI-4	Putative enzymes
STM/PALES_41191	PA0727	Hypothetical protein from bacteriophage Pfl	LES prophage 6	Related to phage, transposon, or plasmid
STM/PALES_45041	None	Hypothetical protein	LES GI-5	Hypothetical, unclassified, unknown

Table 2. Multi-hosts virulence assessed of the 11 PPs or GIs STM mutants

STM Mutants	PPs/GIs	Virulence ^a	
		Rat	<i>Dictyostelium discoideum</i>
STM/PALES_06181	LES prophage 1	-	-
STM/PALES_08021	LES prophage 2	-	+
STM/PALES_13261	LES prophage 3	-	-
STM/PALES_13451	LES prophage 3	-	+
STM/PALES_13521	LES prophage 3	-	-
STM/PALES_13541	LES prophage 3	-	-
STM/PALES_25621	LES prophage 5	-	-
STM/PALES_30891	LES GI-4	-	-
STM/PALES_31031	LES GI-4	-	-
STM/PALES_41191	LES prophage 6	-	+
STM/PALES_45041	LES GI-5	-	+

^a virulent (+); avirulent (-)

Table 3. QPCR primers used in this study.

Target gene/primer name	Primer sequences (5'- 3')	Amplicon size (bps)	Reference
PALES_08011	F: ATGATTTGGTTTCGGCTGGGTTTAT R: CATCTTCCTCACCATCAACCAGAAC	153	This study
STM/PALES_08021-1	F: ATCAGCAACCTGAGCCTGGTAGATA R: GCATCTCGAGGTATCCGGTCATAC	141	This study
STM/PALES_08021-2	F: ACCTGTTGGTGATCGACGAGGTAG R: GATGAATCGCCGGATATCTACCAG	149	This study
PALES_08031	F: AACCGTTGGACGAGGTTCTGAG R: GTGTCATACCCAGTTTCACCTCAC	166	This study
PALES_13511	F: CTACATGTCGGCCGAGTCTCTTAC R: AGCAACAGCTTCGTATAACCGATCC	147	This study
STM/PALES_13521-1	F: GATGAACCTGATCGATCGTCTACTG R: ATGGAGACCGCAGACTTCTGTAGC	174	This study
STM/PALES_13521-2	F: ATGCCTACCACCAACTGGTCAAGTC R: ATTGTTGCTCTCGTTGGGGAAAT	170	This study
PALES_13531	F: GATCATCCTGGCTACCTACGGAGAG R: GTTACCGGTCAGAACCGCATAGAC	154	This study
rpsL	F: GCAAGCGCATGGTCGACAAGA R: CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA	201	This study

Table S1. 162 STM mutants defective for *in vivo* maintenance selected from a 9216 LESB58 STM mutants collection.

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_03311	PA0336	YgdP, dinucleoside polyphosphate hydrolase	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_00271	PA0028	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_01421	PA0141	Conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_01721	PA0171	Hypothetical protein	Motility & Attachment
STM/PALES_02341	PA0237	Probable oxidoreductase	Putative enzymes
STM/PALES_03211	PA0326	Putative permease of ABC transporter-probable	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_03581	PA0361	Probable gamma-glutamyltranspeptidase precursor	Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_03721	PA0375	Cell division protein FtsX	Cell division
STM/PALES_04001	PA0402	PyrB Aspartate carbamoyltransferase	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_04001	PA0402	PyrB, aspartate carbamoyltransferase	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_04001	PA0402	PyrB, aspartate carbamoyltransferase	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_04111	PA0413	ChpA, still frameshift putative component of chemotactic signal transduction system	Chemotaxis / Motility & Attachment / Two-component regulatory systems
STM/PALES_04721	PA0476	Probable permease	Transport of small molecules
STM/PALES_04731	PA0477	Probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
STM/PALES_06181	PA0622	Probable bacteriophage protein (LES prophage 1)	Related to phage, transposon, or plasmid
STM/PALES_06501	PA4278	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_07011	PA4226	Dihydroaeruginic acid synthetase, pchE	Transport of small molecules / Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
STM/PALES_07801	PA4147	Transcriptional regulator AcoR	Transcriptional regulators
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_07851	PA4142	Probable secretion protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_08021	PA4812 (30.99%)	DNA replication protein DnaC (LES prophage 2)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_08731	PA4100	Probable dehydrogenase	Central intermediary metabolism
STM/PALES_08731	PA4100	Probable dehydrogenase	Central intermediary metabolism

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_08751	PA4098	Putative short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
STM/PALES_09761	PA4000	Possible lipoprotein, rlpA family	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_10251	PA3950	Probable ATP-dependent RNA helicase	Transcription, RNA processing and degradation
STM/PALES_10401	PA3936	Probable permease of ABC taurine transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_11481	PA3826	Hypothetical protein	Membrane proteins
STM/PALES_11741	PA3800	Conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_11981	PA3776	Probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
STM/PALES_12161	PA3763	Phosphoribosylformylglycinamide synthase PurL	Nucleotide biosynthesis and metabolism
STM/PALES_13181	PA3666	Tetrahydrodipicolinate succinylase	Cell wall / LPS / capsule
STM/PALES_13261	None	Hypothetical protein (LES prophage 3)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13451	PA2894 (35%)	Putative uncharacterized protein PflO1_0304 (LES prophage 3)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13521	None	Putative portal protein, phage portal 2 (LES prophage 3)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13541	None	Hypothetical protein (LES prophage 3)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_13541	None	Hypothetical protein (LES prophage 3)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_14121	PA3623	Putative lipoprotein NlpD	Cell wall / LPS / capsule
STM/PALES_14131	PA3622	Sigma factor RpoS	Transcriptional regulators
STM/PALES_18391	PA3228	Probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_18571	PA3210	Potassium uptake protein TrkH	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_18661	PA3201	Intracellular septation protein A	Cell division
STM/PALES_19021	PA3166	Chorismate mutase, PheA	Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_19401	PA3119	Putative biotin synthesis protein	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
STM/PALES_19521	PA3108	Amidophosphoribosyltransferase, PurF	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_19521	PA3108	Amidophosphoribosyltransferase PurF	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_19521	PA3108	Amidophosphoribosyltransferase PurF	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_20431	PA3019	Probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport of small molecules
STM/PALES_20891	PA2974	Probable hydrolase	Putative enzymes
STM/PALES_21911	PA2873	Transglutaminase-like domain protein	Putative enzymes
STM/PALES_22061	PA2858	Putative ABC transporter, permease protein	Transport of small molecules
STM/PALES_22341	PA2831	Putative zinc carboxypeptidase	Putative enzymes
STM/PALES_23991	PA2705	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_23991	PA2705	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_23991	PA2705	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_24171	PA2687	PfeS, two-component sensor	Two-component regulatory systems
STM/PALES_24551	PA2650	Putative methyltransferase/NADH dehydrogenase I chain N, nuoN	Antibiotic resistance and susceptibility
STM/PALES_25621	None (PA0629 77,5%)	Lytic enzyme (LES prophage 5)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_26031	PA2585	Excinuclease ABC subunit C, UvrC	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_26031	PA2585	UvrC, excinuclease ABC subunit C	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_27111	PA2583	Probable sensor /response regulator hybrid	Transcriptional regulators / Two-component regulatory systems
STM/PALES_27521	PA2542	Conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_28991	PA2397(57.35%)	Pyoverdine biosynthesis protein PvdE	Transport of small molecules / Membrane proteins /Adaptation, Protection
STM/PALES_29051	PA2397	Pyoverdine biosynthesis protein PvdE	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_30621	PA2242	PslL, possible acetyltransferase	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_30891	None	Hypothetical protein (LES GI-4)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_31041	PA2005 (37.45%)	Propionate catabolism operon regulator PrpR (LES GI-4)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_31971	PA2130	CupA3, fimbrial usher protein	Motility & Attachment
STM/PALES_33001	PA2023	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, GalU	Central intermediary metabolism

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_33651	PA1958	Probable transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_33651	PA1958	Probable transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_33701	PA1953	Putative double-glycine peptidase	Putative enzymes
STM/PALES_33821	PA1941	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_33821	PA1941	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_34141	PA1910	Ferric-mycobactin receptor, FemA* new class function	Transport of small molecules / Transcriptional regulators
STM/PALES_34271	PA1897	Putative desaturase	Fatty acid and phospholipid metabolism
STM/PALES_34401	PA1883	Putative NADH- ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase	Energy metabolism
STM/PALES_36041	PA1725	PscL, type III export protein	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_36081	PA1721	Type III export protein PscH	Protein secretion/export apparatus
STM/PALES_37591	PA1569	Prob major facilitator superfamily (MFS) transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_37671	PA1562	AcnA, aconitate hydratase 1	Energy metabolism
STM/PALES_39541	PA1459	Probable methyltransferase	Chemotaxis
STM/PALES_39591	PA1454	Flagellar synthesis regulator FleN	Motility & Attachment
STM/PALES_39641	PA1449	Flagellar biosynthetic protein FlhB3	Motility & Attachment / Adaptation, Protection / Chemotaxis
STM/PALES_39881	PA1425	Probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport of small molecules
STM/PALES_39891	PA1424	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_41191	PA0727	Hypothetical protein from bacteriophage Pfl (LES prophage 6)	Related to phage, transposon, or plasmid
STM/PALES_41401	PA1181	Putative sensor protein	Membrane proteins
STM/PALES_41751	PA1144	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_42221	PA1099	FleR, two-component response regulator	Two-component regulatory systems / Transcriptional regulators / Motility & Attachment
STM/PALES_42351	PA1086	Flagellar hook-associated protein 1, FlgK	Motility & Attachment / Cell wall / LPS / capsule
STM/PALES_43001	PA1024	2-Nitropropane Dioxygenase	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_43001	PA1024	2-Nitropropane Dioxygenase	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_43121	PA1013	PurC, phosphoribosylaminoimidazole- succinocarboxamidesynthase	Nucleotide biosynthesis and metabolism
STM/PALES_43491	PA0965	Holliday junction resolvase RuvC	DNA replication, recombination, modification and repair

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_43701	PA0945	PurM, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	Nucleotide biosynthesis and metabolism
STM/PALES_43841	PA0932	CysM, cysteine synthase B	Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_43881	PA0928	Sensor/response regulator hybrid GacS	Two-component regulatory systems
STM/PALES_44181	PA0898	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_44581	PA0860	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_44761	PA0842	Probable glycosyl transferase	Putative enzymes
STM/PALES_45041	None	Hypothetical protein (LES GI-5)	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_45121	PA0831	Transcriptional regulator OruR	Transcriptional regulators
STM/PALES_45141	PA0829	Probable hydrolase	Putative enzymes
STM/PALES_45311	PA0811	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_45311	PA0811	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_45471	PA0795	Citrate synthase 2, PrpC	Carbon compound catabolism / Central intermediary metabolism
STM/PALES_45471	PA0795	Citrate synthase 2, PrpC	Carbon compound catabolism / Central intermediary metabolism
STM/PALES_45481	PA0794	Probable aconitate hydratase	Energy metabolism
STM/PALES_45491	PA0793	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_45501	PA0792	PrpD, propionate catabolic protein	Carbon compound catabolism
STM/PALES_45771	PA0766	Serine protease MucD precursor	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) / Cell wall / LPS / capsule / Putative enzymes
STM/PALES_46381	PA0692	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_46401	PA0690	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_46611	PA4281	Exonuclease SbcD	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_46631	PA4283	Exodeoxyribonuclease V alpha chain, RecD	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_46631	PA4283	RecD, exodeoxyribonuclease V alpha chain	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_46641	PA4284	Exodeoxyribonuclease V beta chain	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_46651	PA4285	Exodeoxyribonuclease V gamma chain, recC	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_46721	PA4292	Putative phosphate transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_47381	PA4360	Putative chromosome segregation ATPase	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_47381	PA4360	COG1196: Chromosome segregation ATPases	Hypothetical, unclassified, unknown

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_48111	PA4432	30S ribosomal protein S9	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_48831	PA4503	Probable permease of ABC transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_48921	PA4512	LpxO1, lipopolysaccharide biosynthetic protein	Cell wall / LPS / capsule / Putative enzymes
STM/PALES_49351	PA4552	PilW, type 4 fimbrial biogenesis protein	Motility & Attachment
STM/PALES_49641	PA4581	Transcriptional regulator RtcR	Transcriptional regulators
STM/PALES_50331	PA4647	UraA, uracil permease	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_50381	PA4652	Putative type 1 pili usher protein CsuD	Motility & Attachment
STM/PALES_50771	PA4692	Putative oxidase	Putative enzymes
STM/PALES_50951	PA4710	Putative haem uptake outer membrane receptor PhuR precursor	Transport of small molecules
STM/PALES_51081	PA4723	DksA, suppressor protein-glutamyl	DNA replication, recombination, modification and repair / Adaptation, Protection / Transcriptional regulators
STM/PALES_51081	PA4723	DksA, suppressor protein	DNA replication, recombination, modification and repair / Adaptation, Protection / Transcriptional regulators
STM/PALES_51431	PA4758	CarA, carbamoyl	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_51431	PA4758	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Amino acid biosynthesis and metabolism
STM/PALES_53221	PA4936	Probable rRNA methylase	Transcription, RNA processing and degradation
STM/PALES_53911	PA5002	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_53941	PA5005	Probable carbamoyl transferase	Putative enzymes
STM/PALES_54031	PA5014	GlnE, glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	Translation, post-translational modification, degradation
STM/PALES_55011	PA511	Lactoylglutathijne lyase	Central intermediary metabolism
STM/PALES_55231	PA5133	Putative membrane-bound metalloproteinase	Cell division
STM/PALES_55351	PA5144	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_55351	PA5144	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_55501	PA5159	Multidrug resistance protein	Antibiotic resistance and susceptibility / Transport of small molecules
STM/PALES_55941	PA5200	OmpR, two-component response regulator	Two-component regulatory systems / Transcriptional regulators / Antibiotic resistance and susceptibility
STM/PALES_56501	PA5256	DsbH, disulfide bond formation protein	Chaperones & heat shock proteins / Translation, post-translational modification, degradation
STM/PALES_56651	PA5271	Hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
STM/PALES_56751	PA5280	Site-specific tyrosine recombinase XerC	DNA replication, recombination, modification and repair

STM mutants	PAO1 ortholog	Putative function / comments	Gene class
STM/PALES_56941	PA5299	Putative acetyl-CoA hydrolase/transferase	Energy metabolism
STM/PALES_57171	PA5322	Phosphomannomutase AlgC	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) / Amino acid biosynthesis and metabolism / Cell wall / LPS / capsule
STM/PALES_57171	PA5322	AlgC, phosphomannomutase	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) / Amino acid biosynthesis and metabolism / Cell wall / LPS / capsule
STM/PALES_57621	PA5367	PstA, membrane protein component of ABC phosphate transporter	Transport of small molecules / Membrane proteins
STM/PALES_57891	PA5393	Putative monooxygenase	Transport of small molecules
STM/PALES_58381	PA5443	UvrD, DNA helicase II	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_58381	PA5443	DNA helicase II, UvrD	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_58381	PA5443	UvrD, DNA helicase II	DNA replication, recombination, modification and repair
STM/PALES_58961	PA5500	Zinc transport protein ZnuC	Transport of small molecules

Figures

Figure 1

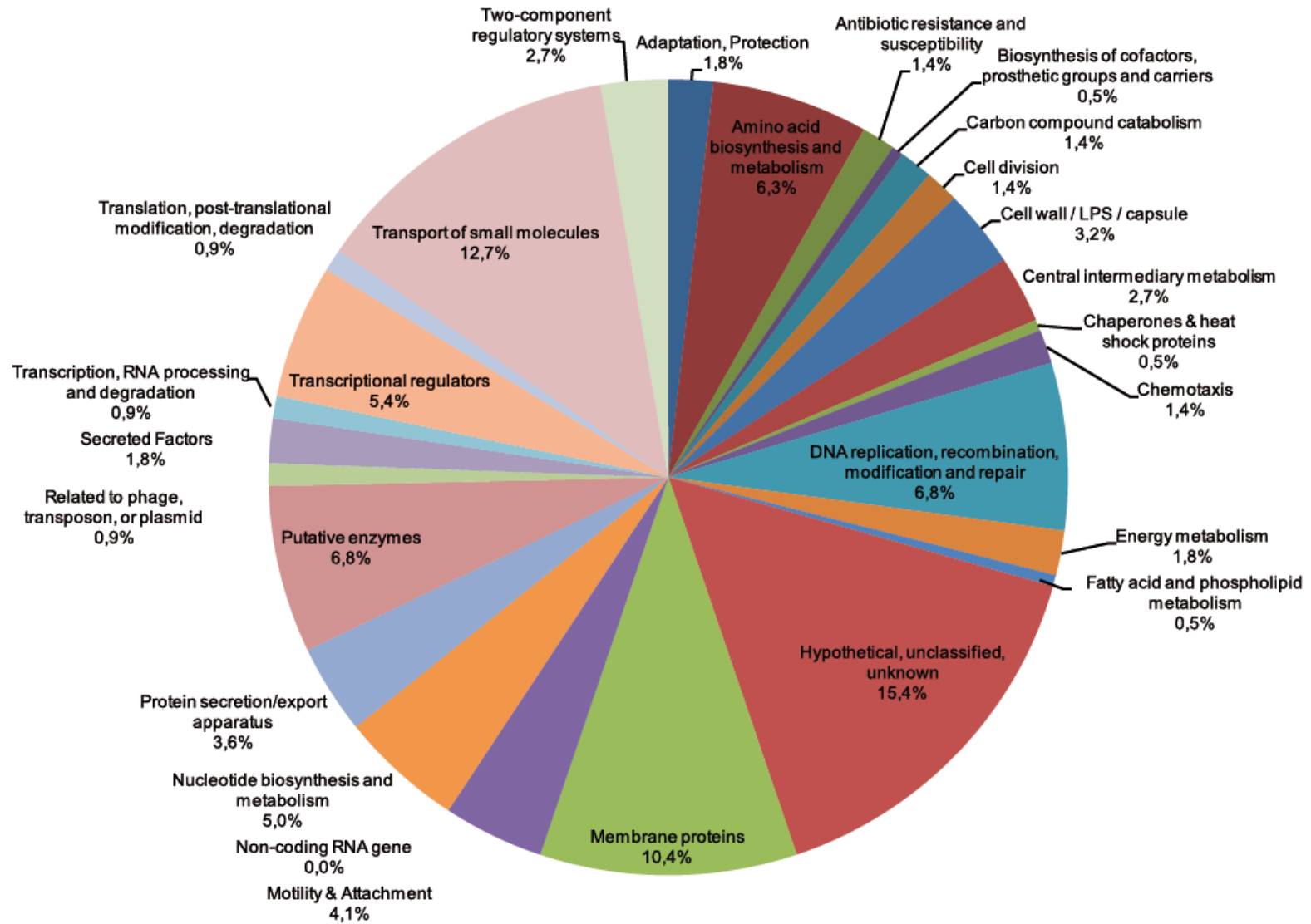


Figure 2

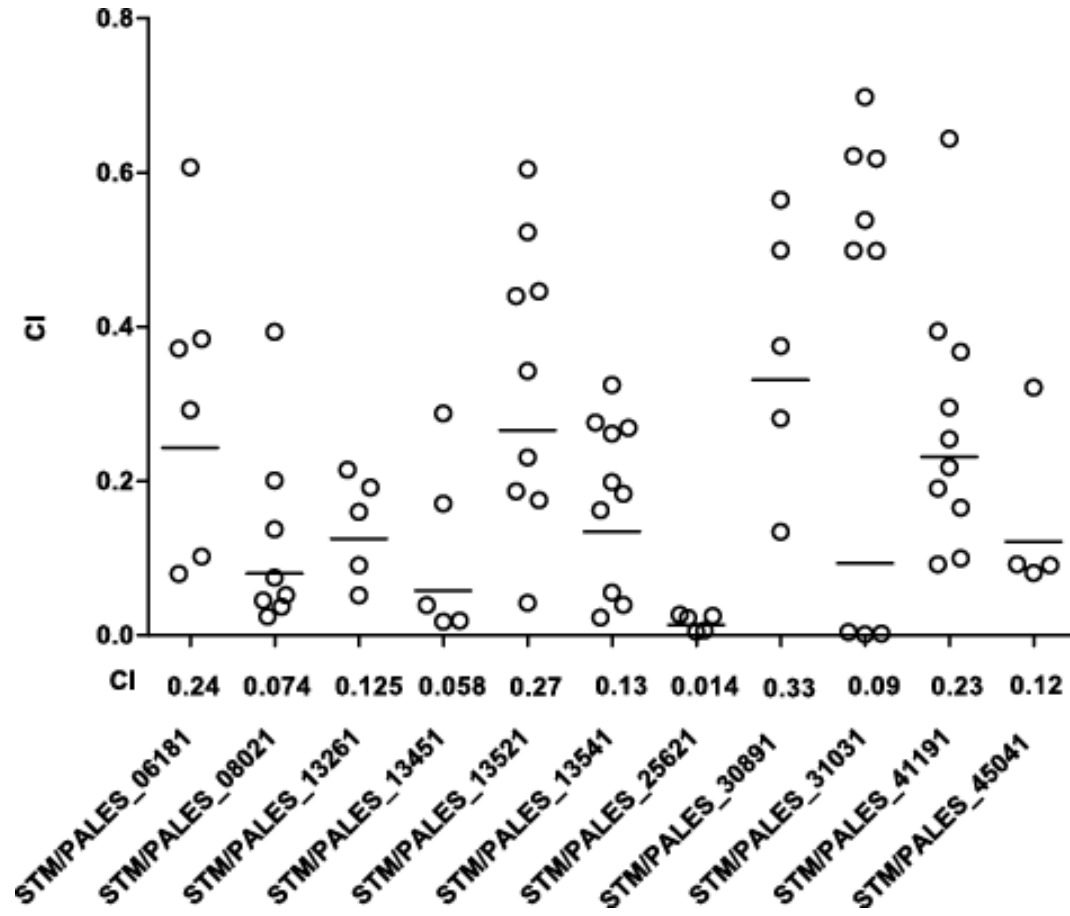


Figure 3

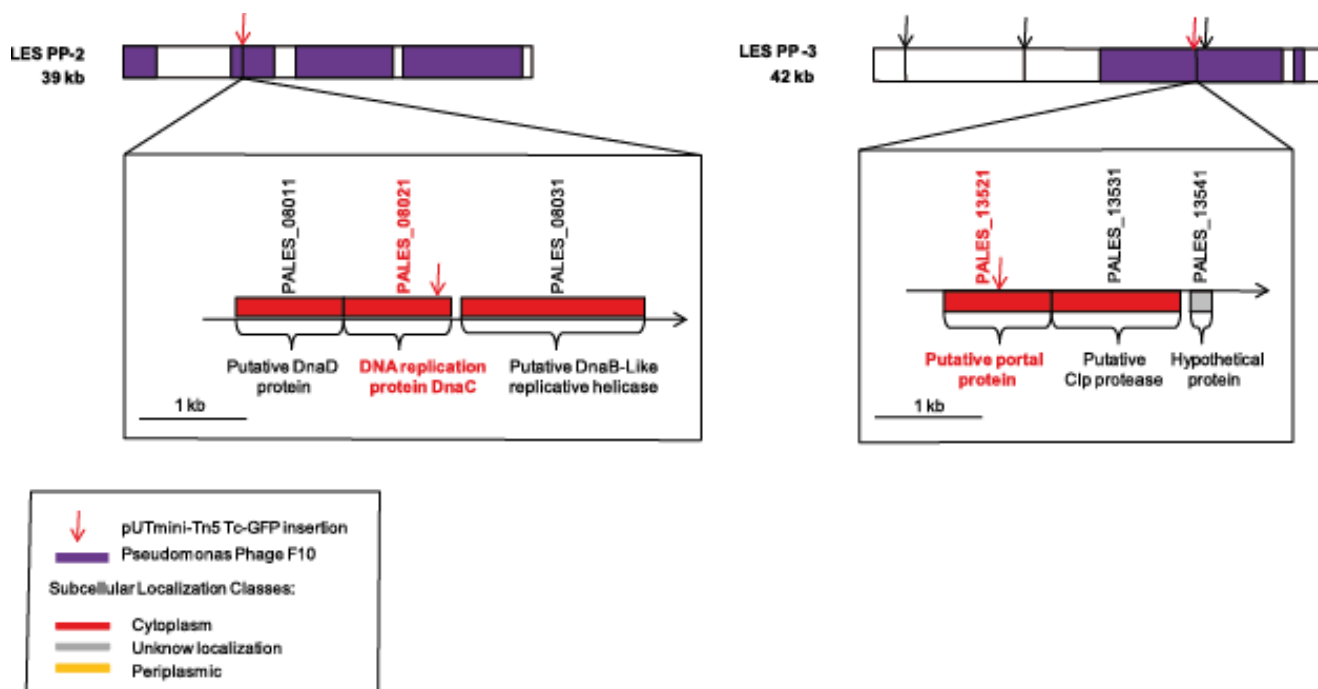


Figure 4

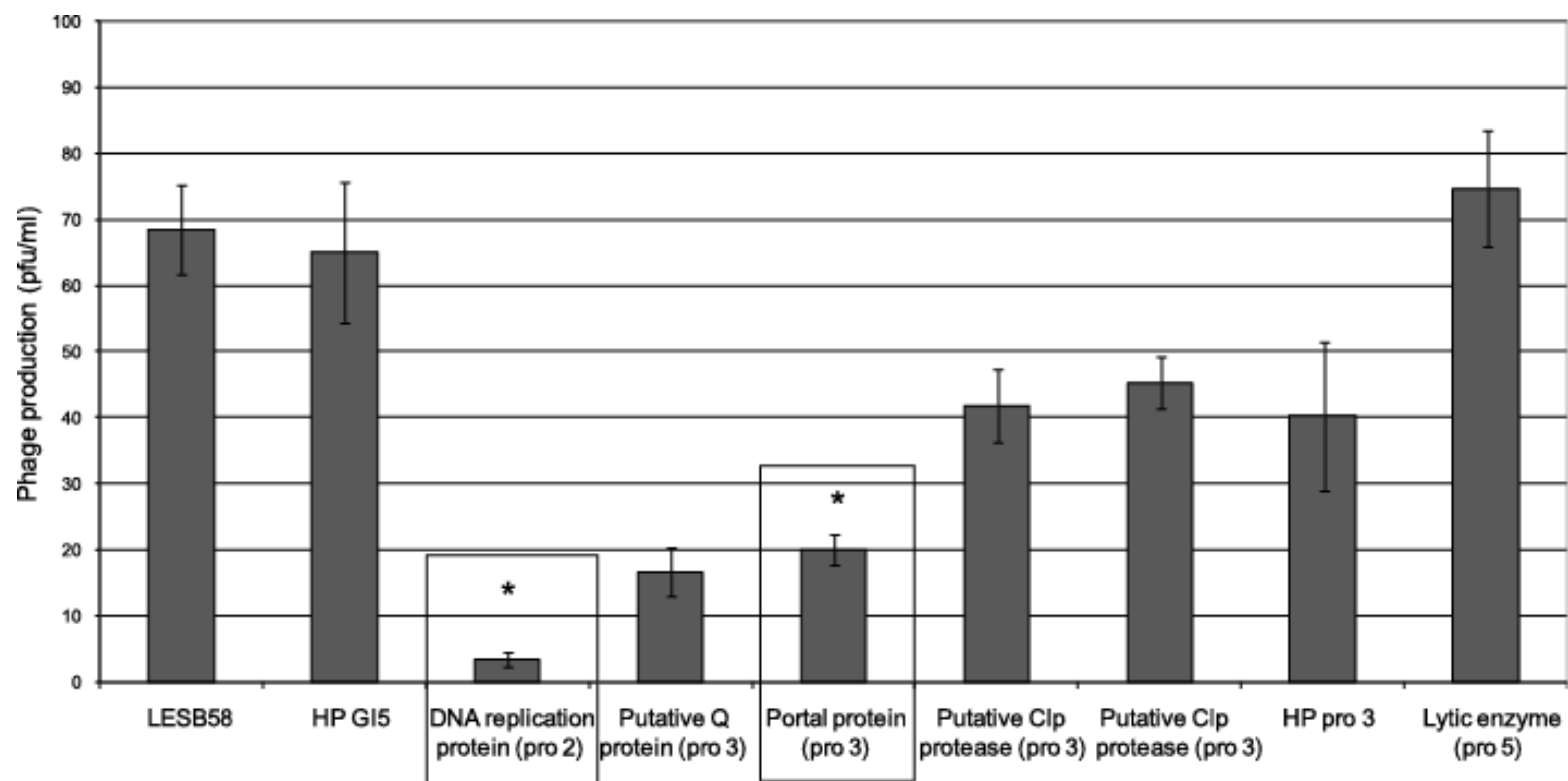


Figure 5

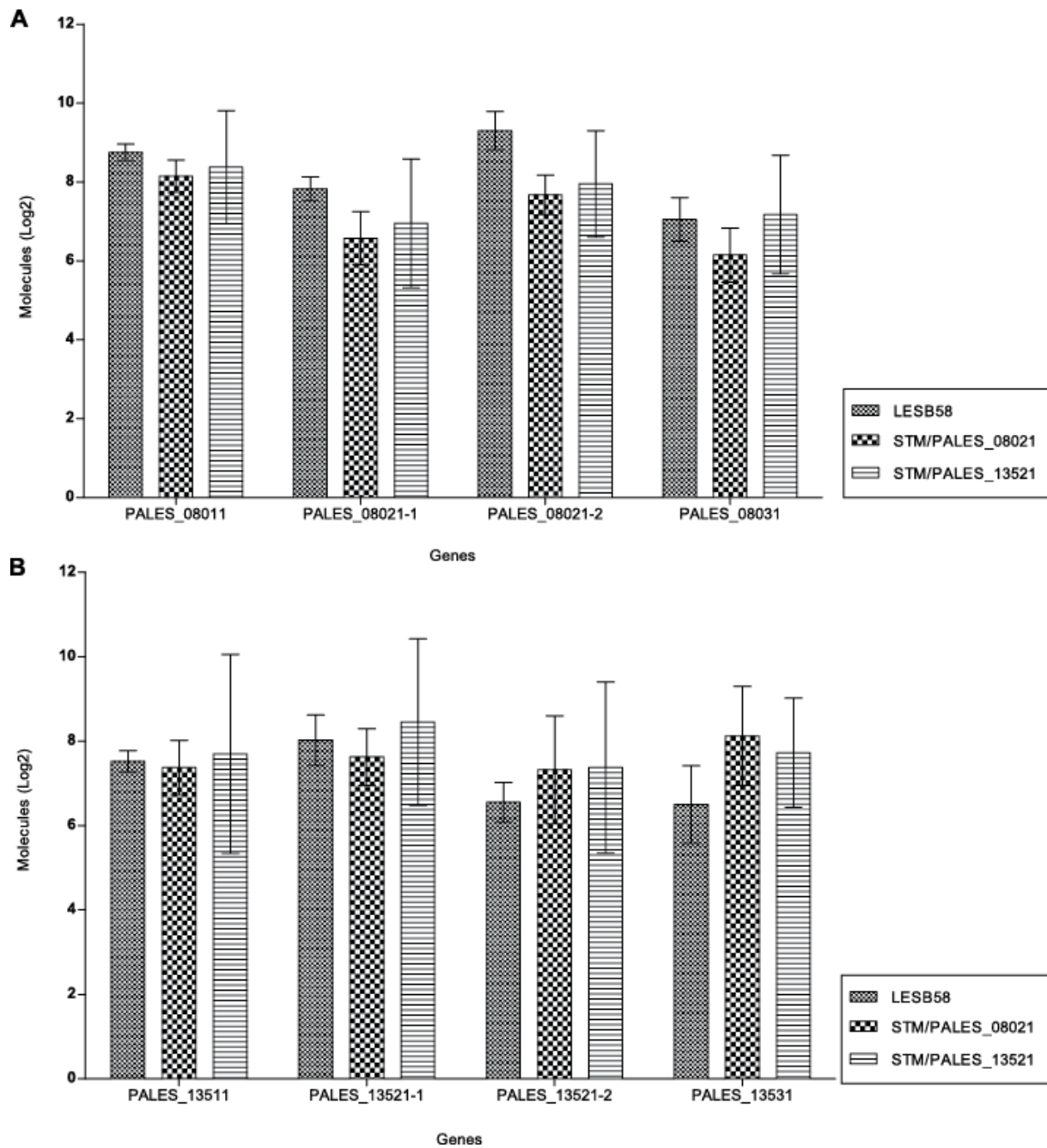


Figure 6

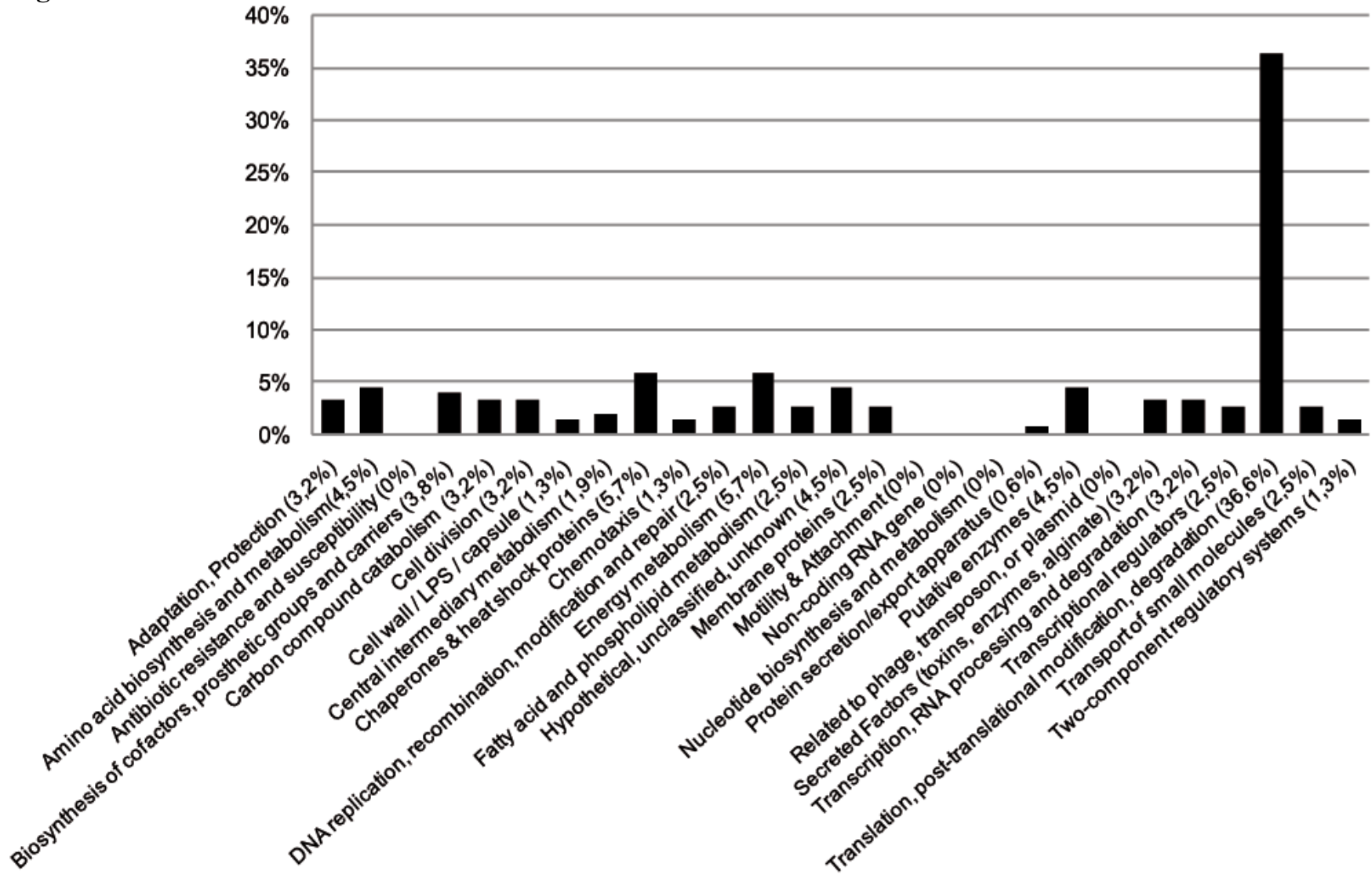
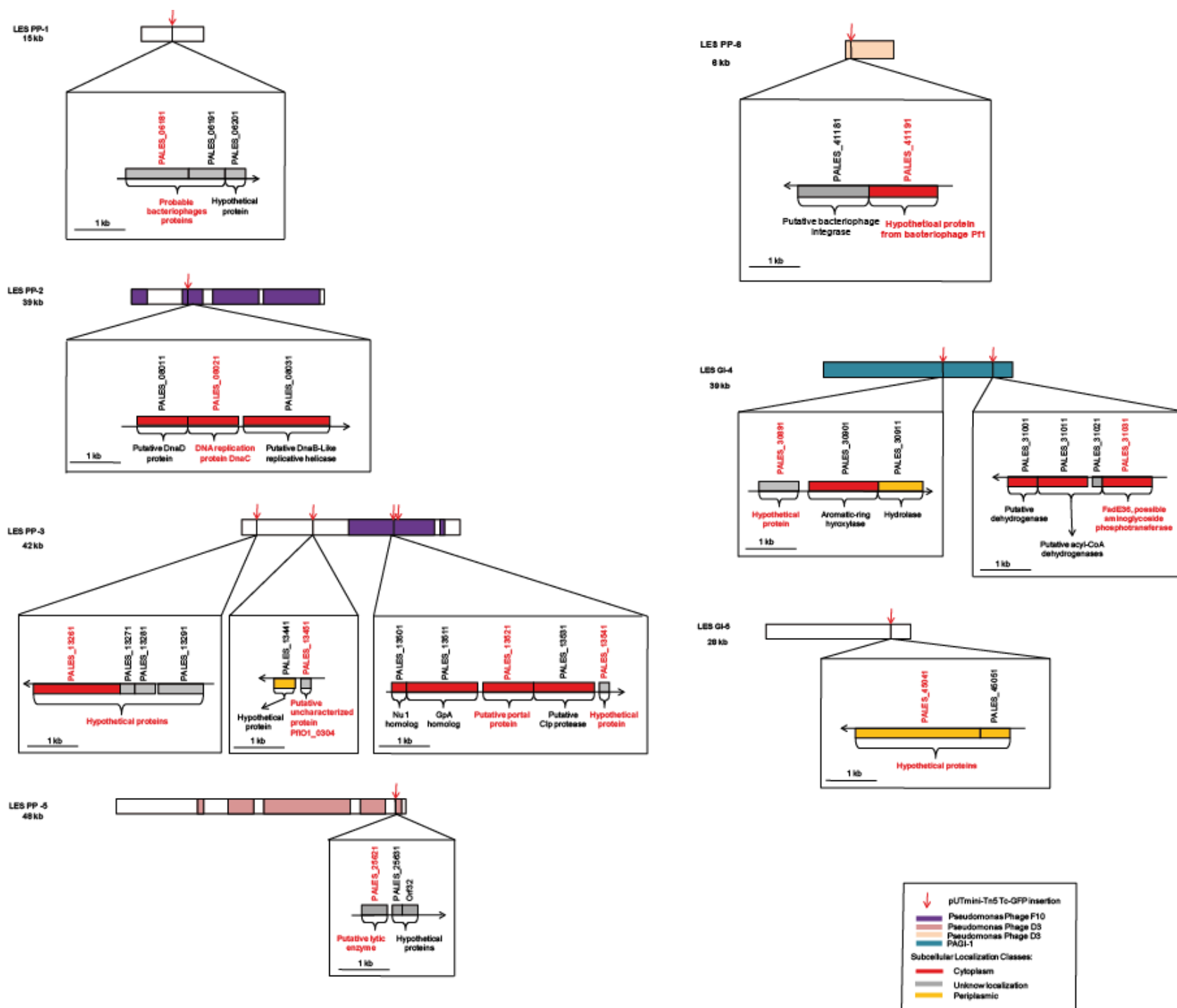


Figure S1



Chapitre 3 : Conclusion

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste redoutable pour les personnes atteintes de FK. En effet, il est responsable de la majorité des infections pulmonaires chroniques incommodant ces patients. LESB58 est une souche épidémique clonale très agressive possédant une résistance accrue aux antibiotiques et une capacité de transmission inhabituelle pour un pathogène opportuniste. L'hypervirulence de la souche est associée à de grandes difficultés de traitement chez les patients FK. Il s'agit d'un défi de haut niveau qui n'est toujours pas relevé à ce jour. Il est très difficile, voire pratiquement impossible, de traiter de façon définitive les infections pulmonaires chroniques chez les patients FK. Des épisodes pratiquement inévitables de récurrence de l'infection et des résistances aux divers antibiotiques utilisés entraînent des difficultés de traitement importantes.

La résistance des agents infectieux aux différents traitements est une problématique qui fait l'objet de nombreuses études à travers le monde, et ce, pour différents microorganismes et dans différents contextes. Il s'agit d'une problématique mondiale et chaque avancée doit être prise en compte dans cette lutte contre les infections résistantes. Dans le cadre de la présente étude, nous tentons de comprendre l'implication de certaines régions génomiques uniques à la souche LESB58 qui seraient associées à son hypervirulence. Le caractère agressif unique et la complexité du caractère opportuniste de la souche nous ont incités à orienter nos recherches vers la compréhension des régions génétiques mobiles et l'identification de gènes particuliers impliqués dans l'établissement et le maintien de l'infection pulmonaire chronique à LESB58 chez les patients FK. À plus long terme, l'identification de protéines provenant de ces régions et présentant un potentiel dans l'établissement et le maintien de LESB58 dans le poumon pourrait servir à établir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de traitements.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était donc l'identification et la caractérisation de gènes uniques à LESB58 et impliqués dans l'établissement ou le maintien de l'infection *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. Trois volets majeurs ont été explorés afin de réaliser mon objectif global.

Dans un premier temps, l'analyse d'une collection de 162 mutants STM défectueux pour la persistance *in vivo* a été réalisée afin de déterminer les gènes candidats pour le projet. Le séquençage des 162 mutants suivi d'analyses bioinformatiques ont permis d'identifier 11 mutants portant une insertion dans un des éléments génétiques mobiles que possèdent LESB58. Ces éléments génétiques mobiles, composés d'îlots génomiques et de prophages, ont déjà été pointé pour leur implication dans l'hypervirulence des souches LES (Fothergill et al. 2010; Winstanley et al. 2009). Les mutants STM/PALES_08021 et STM/PALES_13521, codant respectivement pour une protéine de réplication (DnaC) du prophage 2 et une protéine putative portale, ont été sélectionnés pour des analyses plus approfondies principalement en raison d'une forte atténuation de leur virulence *in vivo*. Dans les deux cas, aucun phénotype n'a été identifié. Des essais phénotypiques tels que la mobilité et la production de phospholipases C, de chromophores, de protéases et du biofilm ont été testés et aucune différence n'a été notée en comparaison avec LESB58 sauvage. La quantification du niveau d'expression des gènes possédant l'insertion et des gènes avoisinants par qPCR a permis de conclure qu'il n'y avait pas d'effet polaire dû à l'insertion du transposon et que le gène directement affecté exprimait un transcrite qui n'était pas significativement différent de la souche sauvage. Nous avons été en mesure, suite à cette expérience, de conclure que le transposon n'affectait pas la transcription du gène et ne provoquait pas d'effet polaire sur les gènes avoisinants. Ces conclusions nous ont permis de poursuivre nos analyses en utilisant les mutants STM et nous ont amené à supposer la présence d'un transcrite du gène résultant en une protéine tronquée ou encore d'un impact sur une autre région du génome ou, possiblement, la combinaison des deux hypothèses.

Un deuxième volet du projet portait sur l'analyse de virulence *in vivo* par détermination des indices de compétition dans le modèle d'infection pulmonaire chronique

chez le rat. En effet, des analyses de pathogénicité sur les 11 mutants sélectionnés à partir de la collection de mutants STM pour leur insertion dans un GI ou un PP ont permis de conclure qu'ils présentaient une perte de virulence variant de 3 à 71 fois lorsque mis en compétition *in vivo* avec la souche LESB58 sauvage. Près de la moitié des mutants possédant une insertion dans un élément génétique mobile ont acquis le transposon préférentiellement dans le prophage 3, suggérant fortement son implication dans la pathogénie de LESB58. Les deux mutants préalablement sélectionnés ont montré une diminution de virulence d'un facteur 4 pour le mutant dans la protéine putative portale et d'un facteur 14 pour le mutant *dnaC*. Les 162 mutants STM défectueux *in vivo* ont également été testés chez *Dictyostelium discoideum* et 52 d'entre eux présentaient une virulence atténuée chez l'amibe. Des 11 mutants dans un GI ou un PP, 9 présentaient également une réduction de la virulence chez *D. discoideum*. Les conclusions de cette approche multi-hôtes confirment, pour la majorité des mutants STM dans un GI/PP, l'implication des gènes uniques à LESB58 dans l'établissement ou le maintien de la bactérie dans son hôte. De plus, il semble que l'amibe, bien que ne pouvant être utilisée comme seul hôte en raison de son métabolisme et mécanisme de survie beaucoup moins près de la réalité que le modèle d'infection pulmonaire chronique chez un mammifère tel que le rat, soit un bon hôte complémentaire (Cosson et al. 2002).

Finalement, un dernier volet du projet consistait à effectuer une analyse transcriptomique comparative entre un mutant et la souche LESB58 sauvage afin de déterminer les impacts de la mutation transpositionnelle sur l'ensemble du génome. Le transcriptome complet du mutant STM/PALES_08021 a été comparé à celui de la souche LESB58 sauvage. Comme nous l'avions observé lors des analyses de qPCR, aucune différence significative du niveau d'expression du gène possédant l'insertion et des gènes avoisinants n'est notée. L'analyse comparative complète des transcrits de STM/PALES_08021 (*dnaC*) et de LESB58 sauvage démontre une forte augmentation des gènes faisant partie de la famille de traduction, modification post-traductionnelle et de dégradation. En effet, plus de 36% des 135 gènes surexprimés se situent dans cette classe de gène, ce qui concorde avec l'hypothèse selon laquelle une protéine tronquée non fonctionnelle est produite suite à l'insertion du transposon, activant alors des éléments de

dégradation des protéines non fonctionnelles. Une augmentation du niveau de transcription des gènes encodant des chaperones, des *heat shock proteins* et en lien avec le métabolisme énergétique est également visible. Ce sont tous des gènes en lien avec les facteurs de stress, ce qui suggère l'état de tension de la bactérie mutante, et ce, dans un système *in vitro* sans facteurs de stress (milieu riche, conditions de croissance idéales, aucune compétition). On peut donc suggérer que, dans un contexte *in vivo* où l'environnement pulmonaire est associé à un très grand facteur de stress pour les microorganismes en raison de la carence nutritionnelle du milieu et du système de défense de l'hôte contre l'agent infectieux, la bactérie soit incapable de faire face à ce stress et soit ainsi inapte à s'établir ou à se maintenir. De plus, des analyses sur la production spontanée de phages par les souches mutantes ont révélé un niveau de phages grandement réduit en comparaison avec la souche sauvage. Bien que l'implication directe des phages actifs dans la pathogénie de LESB58 soit encore mal comprise, il est évident que l'absence de phages actifs a une importance dans la virulence de LESB58 (Fothergill et al. 2011).

En conclusion, la présence d'une mutation insertionnelle dans le gène *dnaC* encodant une protéine de réplication du prophage 2 est associée avec la perte de virulence *in vivo*, la réduction de la production spontanée de phages et l'activation de la réponse aux facteurs de stress et de dégradation *in vitro*. Rien de ce que nous avons observé par des études de transcriptomique ne nous indique clairement le mécanisme par lequel la bactérie perd de sa virulence. L'hypothèse que nous émettons à ce sujet est que l'incapacité du mutant STM/PALES_08021 à établir ou à maintenir l'infection dans le modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat serait directement en lien avec l'inactivation du prophage 2. En effet, l'état de stress de la bactérie *in vitro* peut être extrapolé *in vivo* et l'on peut s'attendre à ce que la bactérie soit incapable de s'établir en raison de l'environnement rude auquel elle doit faire face. De plus, la présence de prophages actifs est potentiellement corrélée avec l'activation de certains gènes de virulence ou la production de phages actifs. De nouvelles technologies telles que le *Single-Cell Sequencing* seraient en mesure de confirmer ce type d'information. Il sera donc pertinent de poursuivre des analyses en focalisant les efforts sur le comportement *in vivo* de la souche et le niveau d'expression des différents gènes potentiellement associés à la virulence et au maintien *in vivo* du pathogène. La

problématique à ce niveau est d'isoler, suite à l'infection *in vivo*, la bactérie en question pour en extraire l'ARNm en quantité suffisante et de qualité adéquate pour effectuer des études de transcriptomique.

Ce projet aura donc apporté des connaissances et questionnements sur l'implication des prophages dans la pathogénie de LESB58. Nous avons identifié des gènes uniques et essentiels à l'établissement et au maintien de LESB58 dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. Nous avons également été en mesure de comprendre et d'affirmer que le comportement *in vivo* semblait différer de celui *in vitro* et qu'il est primordial d'orienter les analyses futures dans cette direction afin de bien établir les facteurs d'hypervirulence associés aux îlots de pathogénicité et prophages de LESB58. Une approche future serait d'étudier le profil transcriptomique des souches mutantes dans un contexte d'infection pulmonaire chronique *in vivo*. En effet, nous avons démontré dans cette étude que les mutants sélectionnés étaient en état de stress, et ce, *in vitro* bien qu'aucun phénotype n'y soit associé. Il est très probable que ce niveau de stress soit augmenté dans un contexte d'infection et que certains facteurs de stress soient alors activés, certains prophages activés et que certains phages soit produits, modifiant le profil transcriptomique de la souche. Il serait alors plus évident de viser précisément de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Bibliographie

- Ai, T., S.G. Bompadre, X. Wang, S. Hu, M. Li, and T.C. Hwang.** *Capsaicin potentiates wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel currents.* *Mol Pharmacol*, 2004. 65(6):1415-1426.
- Akhverdian, V.Z., E.A. Khrenova, V.G. Bogush, T.V. Gerasimova, and N.B. Kirsanov.** [Wide distribution of transposable phages in natural *Pseudomonas aeruginosa* populations]. *Genetika*, 1984. 20(10):1612-1619.
- Al-Aloul, M., J. Crawley, C. Winstanley, C.A. Hart, M.J. Ledson, and M.J. Walshaw.** *Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients.* *Thorax*, 2004. 59(4):334-336.
- Allewelt, M., F.T. Coleman, M. Grout, G.P. Priebe, and G.B. Pier.** *Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread.* *Infect Immun*, 2000. 68(7):3998-4004.
- Alm, R.A., A.J. Boderer, P.D. Free, and J.S. Mattick.** *Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*.* *J Bacteriol*, 1996. 178(1):46-53.
- Alm, R.A. and J.S. Mattick.** *Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence.* *Mol Microbiol*, 1995. 16(3):485-496.
- Antigny, F., C. Norez, F. Becq, and C. Vandebrouck.** *Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR.* *Cell Calcium*, 2008. 43(2):175-183.
- Anwar, H., M.K. Dasgupta, and J.W. Costerton.** *Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(11):2043-2046.
- Anwar, H., J.L. Strap, and J.W. Costerton.** *Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(7):1347-1351.
- Armstrong, D., S. Bell, M. Robinson, P. Bye, B. Rose, C. Harbour, C. Lee, H. Service, M. Nissen, M. Syrnis, and C. Wainwright.** *Evidence for spread of a clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* among cystic fibrosis clinics.* *J Clin Microbiol*, 2003. 41(5):2266-2267.
- Armstrong, D.S., K. Grimwood, R. Carzino, J.B. Carlin, A. Olinsky, and P.D. Phelan.** *Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis.* *BMJ*, 1995. 310(6994):1571-1572.
- Avidano, M.A., C.S. Cotter, S.P. Stringer, and G.S. Schultz.** *Analysis of protease activity in human otitis media.* *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998. 119(4):346-351.
- Ball, C.A., K. Dolinski, S.S. Dwight, M.A. Harris, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, C.R. Scafe, G. Sherlock, G. Binkley, H. Jin, M. Kaloper, S.D. Orr, M. Schroeder, S. Weng, Y. Zhu, D. Botstein, and J.M. Cherry.** *Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database.* *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(1):77-80.
- Balloy, V., A. Verma, S. Kuravi, M. Si-Tahar, M. Chignard, and R. Ramphal.** *The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*.* *J Infect Dis*, 2007. 196(2):289-296.

- Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, W. Smits, R. Ahrens, and R. Fick.** *The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol*, 1995. 20(2):63-70.
- Barbieri, J.T. and J. Sun.** *Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT. Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2004. 152:79-92.
- Bardy, S.L. and K.F. Jarrell.** *Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon Methanococcus voltae. Mol Microbiol*, 2003. 50(4):1339-1347.
- Barker, A.P., A.I. Vasil, A. Filloux, G. Ball, P.J. Wilderman, and M.L. Vasil.** *A novel extracellular phospholipase C of Pseudomonas aeruginosa is required for phospholipid chemotaxis. Mol Microbiol*, 2004. 53(4):1089-1098.
- Barkow, S.R., I. Levchenko, T.A. Baker, and R.T. Sauer.** *Polypeptide translocation by the AAA+ ClpXP protease machine. Chem Biol*, 2009. 16(6):605-612.
- Baumann, U., S. Wu, K.M. Flaherty, and D.B. McKay.** *Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. EMBO J*, 1993. 12(9):3357-3364.
- Bebok, Z., C.J. Venglarik, Z. Panczel, T. Jilling, K.L. Kirk, and E.J. Sorscher.** *Activation of DeltaF508 CFTR in an epithelial monolayer. Am J Physiol*, 1998. 275(2 Pt 1):C599-607.
- Bennett, P.M.** *Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. Methods Mol Biol*, 2004. 266:71-113.
- Berg, H.C.** *Symmetries in bacterial motility. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25):14225-14228.
- Berthelot, P., I. Attree, P. Plesiat, J. Chabert, S. de Bentzmann, B. Pozzetto, and F. Grattard.** *Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. J Infect Dis*, 2003. 188(4):512-518.
- Berto, P., P. Commenil, L. Belingheri, and B. Dehorter.** *Occurrence of a lipase in spores of Alternaria brassicicola with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. FEMS Microbiol Lett*, 1999. 180(2):183-189.
- Bertrand, J.J., J.T. West, and J.N. Engel.** *Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol*, 2010. 192(4):994-1010.
- Blattner, F.R., G. Plunkett, 3rd, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science*, 1997. 277(5331):1453-1462.
- Bleves, S., V. Viarre, R. Salacha, G.P. Michel, A. Filloux, and R. Voulhoux.** *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. Int J Med Microbiol*, 2010. 300(8):534-543.
- Bonfield, T.L., M.W. Konstan, and M. Berger.** *Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(1):72-78.
- Bonfield, T.L., M.W. Konstan, P. Burfeind, J.R. Panuska, J.B. Hilliard, and M. Berger.** *Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995a. 13(3):257-261.

- Bonfield, T.L., J.R. Panuska, M.W. Konstan, K.A. Hilliard, J.B. Hilliard, H. Ghnaim, and M. Berger.** *Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. Am J Respir Crit Care Med*, 1995b. 152(6 Pt 1):2111-2118.
- Borowitz, D., P.R. Durie, L.L. Clarke, S.L. Werlin, C.J. Taylor, J. Semler, R.C. De Lisle, P. Lewindon, S.M. Lichtman, M. Sinaasappel, R.D. Baker, S.S. Baker, H.J. Verkade, M.E. Lowe, V.A. Stallings, M. Janghorbani, R. Butler, and J. Heubi.** *Gastrointestinal outcomes and confounders in cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005. 41(3):273-285.
- Boucher, R.C.** *Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. J Intern Med*, 2007. 261(1):5-16.
- Brockhurst, M.A., N. Colegrave, and D.E. Rozen.** *Next-generation sequencing as a tool to study microbial evolution. Mol Ecol*, 2011. 20(5):972-980.
- Brown, M.R., P.J. Collier, and P. Gilbert.** *Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(9):1623-1628.
- Burland, V., Y. Shao, N.T. Perna, G. Plunkett, H.J. Sofia, and F.R. Blattner.** *The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Escherichia coli O157:H7. Nucleic Acids Res*, 1998. 26(18):4196-4204.
- Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guedon.** *Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol Microbiol*, 2002. 46(3):601-610.
- Burrus, V. and M.K. Waldor.** *Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res Microbiol*, 2004. 155(5):376-386.
- Cabral, D.A., B.A. Loh, and D.P. Speert.** *Mucoid Pseudomonas aeruginosa resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. Pediatr Res*, 1987. 22(4):429-431.
- Campodonico, V.L., M. Gadjeva, C. Paradis-Bleau, A. Uluer, and G.B. Pier.** *Airway epithelial control of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Trends Mol Med*, 2008. 14(3):120-133.
- Carter, M.E., J.L. Fothergill, M.J. Walshaw, K. Rajakumar, A. Kadioglu, and C. Winstanley.** *A subtype of a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis epidemic strain exhibits enhanced virulence in a murine model of acute respiratory infection. J Infect Dis*, 2010. 202(6):935-942.
- Cash, H.A., D.E. Woods, B. McCullough, W.G. Johanson, Jr., and J.A. Bass.** *A rat model of chronic respiratory infection with Pseudomonas aeruginosa. Am Rev Respir Dis*, 1979. 119(3):453-459.
- Castonguay-Vanier, J., L. Vial, J. Tremblay, and E. Deziel.** *Drosophila melanogaster as a model host for the Burkholderia cepacia complex. PLoS One*, 2010. 5(7):e11467.
- Cheng, K., R.L. Smyth, J.R. Govan, C. Doherty, C. Winstanley, N. Denning, D.P. Heaf, H. van Saene, and C.A. Hart.** *Spread of beta-lactam-resistant Pseudomonas aeruginosa in a cystic fibrosis clinic. Lancet*, 1996. 348(9028):639-642.
- Cheung, D.O., K. Halsey, and D.P. Speert.** *Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun*, 2000. 68(8):4585-4592.
- Chmiel, J.F., M. Berger, and M.W. Konstan.** *The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy Immunol*, 2002. 23(1):5-27.

- Chugani, S.A., M. Whiteley, K.M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil, and E.P. Greenberg.** *QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in Pseudomonas aeruginosa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(5):2752-2757.
- Clarke, L.L., L.R. Gawenis, E.M. Bradford, L.M. Judd, K.T. Boyle, J.E. Simpson, G.E. Shull, H. Tanabe, A.J. Ouellette, C.L. Franklin, and N.M. Walker.** *Abnormal Paneth cell granule dissolution and compromised resistance to bacterial colonization in the intestine of CF mice.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286(6):G1050-1058.
- Coffman, T.J., C.D. Cox, B.L. Edeker, and B.E. Britigan.** *Possible role of bacterial siderophores in inflammation. Iron bound to the Pseudomonas siderophore pyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst.* *J Clin Invest*, 1990. 86(4):1030-1037.
- Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B.G. Barrell.** *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* *Nature*, 1998. 393(6685):537-544.
- Colvin, K.M., V.D. Gordon, K. Murakami, B.R. Borlee, D.J. Wozniak, G.C. Wong, and M.R. Parsek.** *The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa.* *PLoS Pathog*, 2011. 7(1):e1001264.
- Cornillon, S., E. Pech, M. Benghezal, K. Ravanel, E. Gaynor, F. Letourneur, F. Bruckert, and P. Cosson.** *Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis.* *J Biol Chem*, 2000. 275(44):34287-34292.
- Cosson, P., L. Zulianello, O. Join-Lambert, F. Faurisson, L. Gebbie, M. Benghezal, C. Van Delden, L.K. Curty, and T. Kohler.** *Pseudomonas aeruginosa virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system.* *J Bacteriol*, 2002. 184(11):3027-3033.
- Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James.** *Biofilms, the customized microniche.* *J Bacteriol*, 1994. 176(8):2137-2142.
- Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg.** *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* *Science*, 1999. 284(5418):1318-1322.
- Coyne, S., P. Courvalin, and M. Galimand.** *Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates.* *Microbiology*, 2010. 156(Pt 5):1448-1458.
- Darling, K.E., A. Dewar, and T.J. Evans.** *Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of Pseudomonas aeruginosa by polarized respiratory epithelial cells.* *Cell Microbiol*, 2004. 6(6):521-533.
- Darzins, A.** *The pilG gene product, required for Pseudomonas aeruginosa pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator CheY.* *J Bacteriol*, 1993. 175(18):5934-5944.
- Darzins, A.** *Characterization of a Pseudomonas aeruginosa gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium Myxococcus xanthus.* *Mol Microbiol*, 1994. 11(1):137-153.
- Davey, M.J., L. Fang, P. McInerney, R.E. Georgescu, and M. O'Donnell.** *The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein.* *EMBO J*, 2002. 21(12):3148-3159.

Davies, D. *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.* *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(2):114-122.

de Bentzmann, S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M.C. Plotkowski, and E. Puchelle. *Asialo GMI is a receptor for Pseudomonas aeruginosa adherence to regenerating respiratory epithelial cells.* *Infect Immun*, 1996. 64(5):1582-1588.

Dodge, J.A. *Gastrointestinal tract and nutrition in cystic fibrosis: pathophysiology.* *J R Soc Med*, 1986. 79 Suppl 12:27-31.

Domenighini, M. and R. Rappuoli. *Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages.* *Mol Microbiol*, 1996. 21(4):667-674.

Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, and C. Quentin. *Clinical strain of Pseudomonas aeruginosa carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(11):3624-3626.

Edson, R.S., R.H. Brey, T.J. McDonald, C.L. Terrell, J.T. McCarthy, and J.M. Thibert. *Vestibular toxicity due to inhaled tobramycin in a patient with renal insufficiency.* *Mayo Clin Proc*, 2004. 79(9):1185-1191.

Eigen, H., B.J. Rosenstein, S. FitzSimmons, and D.V. Schidlow. *A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis.* *Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. J Pediatr*, 1995. 126(4):515-523.

Engel, J. and P. Balachandran. *Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease.* *Curr Opin Microbiol*, 2009. 12(1):61-66.

Engel, L.S., J.M. Hill, A.R. Caballero, L.C. Green, and R.J. O'Callaghan. *Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa.* *J Biol Chem*, 1998. 273(27):16792-16797.

Ernst, R.K., D.A. D'Argenio, J.K. Ichikawa, M.G. Banger, S. Selgrade, J.L. Burns, P. Hiatt, K. McCoy, M. Brittnacher, A. Kas, D.H. Spencer, M.V. Olson, B.W. Ramsey, S. Lory, and S.I. Miller. *Genome mosaicism is conserved but not unique in Pseudomonas aeruginosa isolates from the airways of young children with cystic fibrosis.* *Environ Microbiol*, 2003. 5(12):1341-1349.

Ferrone, M., M. Raimondo, and J.S. Scolapio. *Pancreatic enzyme pharmacotherapy.* *Pharmacotherapy*, 2007. 27(6):910-920.

Flume, P.A., K.A. Robinson, B.P. O'Sullivan, J.D. Finder, R.L. Vender, D.B. Willey-Courand, T.B. White, and B.C. Marshall. *Cystic fibrosis pulmonary guidelines: airway clearance therapies.* *Respir Care*, 2009. 54(4):522-537.

Fothergill, J.L., E. Mowat, M.J. Ledson, M.J. Walshaw, and C. Winstanley. *Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of Pseudomonas aeruginosa in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations.* *J Med Microbiol*, 2010. 59(Pt 4):472-481.

Fothergill, J.L., E. Mowat, M.J. Walshaw, M.J. Ledson, C.E. James, and C. Winstanley. *Effect of antibiotic treatment on bacteriophage production by a cystic fibrosis epidemic strain of Pseudomonas aeruginosa.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(1):426-428.

Fothergill, J.L., S. Panagea, C.A. Hart, M.J. Walshaw, T.L. Pitt, and C. Winstanley. *Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain.* *BMC Microbiol*, 2007. 7:45.

- Frees, D., S.N. Qazi, P.J. Hill, and H. Ingmer.** *Alternative roles of ClpX and ClpP in Staphylococcus aureus stress tolerance and virulence.* *Mol Microbiol*, 2003. 48(6):1565-1578.
- Fridge, J.L., C. Conrad, L. Gerson, R.O. Castillo, and K. Cox.** *Risk factors for small bowel bacterial overgrowth in cystic fibrosis.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007. 44(2):212-218.
- Friedman, L. and R. Kolter.** *Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms.* *Mol Microbiol*, 2004. 51(3):675-690.
- Fritz, J.H., R.L. Ferrero, D.J. Philpott, and S.E. Girardin.** *Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.* *Nat Immunol*, 2006. 7(12):1250-1257.
- Fuchs, H.J., D.S. Borowitz, D.H. Christiansen, E.M. Morris, M.L. Nash, B.W. Ramsey, B.J. Rosenstein, A.L. Smith, and M.E. Wohl.** *Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis.* *The Pulmozyme Study Group. N Engl J Med*, 1994. 331(10):637-642.
- Galloway, D.R.** *Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments.* *Mol Microbiol*, 1991. 5(10):2315-2321.
- Gaskin, K., D. Waters, S. Dorney, M. Gruca, M. O'Halloran, and B. Wilcken.** *Assessment of pancreatic function in screened infants with cystic fibrosis.* *Pediatr Pulmonol Suppl*, 1991. 7:69-71.
- Gilbert, P., P.J. Collier, and M.R. Brown.** *Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(10):1865-1868.
- Goldman, M.J., G.M. Anderson, E.D. Stolzenberg, U.P. Kari, M. Zasloff, and J.M. Wilson.** *Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis.* *Cell*, 1997. 88(4):553-560.
- Goure, J., P. Broz, O. Attree, G.R. Cornelis, and I. Attree.** *Protective anti-V antibodies inhibit Pseudomonas and Yersinia translocon assembly within host membranes.* *J Infect Dis*, 2005. 192(2):218-225.
- Govan, J.R. and V. Deretic.** *Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia.* *Microbiol Rev*, 1996. 60(3):539-574.
- Graupner, S., N. Weger, M. Sohni, and W. Wackernagel.** *Requirement of novel competence genes pilT and pilU of Pseudomonas stutzeri for natural transformation and suppression of pilT deficiency by a hexahistidine tag on the type IV pilus protein PilAI.* *J Bacteriol*, 2001. 183(16):4694-4701.
- Hahn, H.P.** *The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa--a review.* *Gene*, 1997. 192(1):99-108.
- Hall, A. and C.D. Nobes.** *Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton.* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000. 355(1399):965-970.
- Hashimoto, S., J.F. Pittet, K. Hong, H. Folkesson, G. Bagby, L. Kobzik, C. Frevert, K. Watanabe, S. Tsurufuji, and J. Wiener-Kronish.** *Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to Pseudomonas airspace infections.* *Am J Physiol*, 1996. 270(5 Pt 1):L819-828.
- Hazes, B., P.A. Sastry, K. Hayakawa, R.J. Read, and R.T. Irvin.** *Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding.* *J Mol Biol*, 2000. 299(4):1005-1017.

- Heck, L.W., P.G. Alarcon, R.M. Kulhavy, K. Morihara, M.W. Russell, and J.F. Mestecky.** *Degradation of IgA proteins by Pseudomonas aeruginosa elastase.* *J Immunol*, 1990. 144(6):2253-2257.
- Heinzel, B., E. Eber, B. Oberwaldner, G. Haas, and M.S. Zach.** *Effects of inhaled gentamicin prophylaxis on acquisition of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: a pilot study.* *Pediatr Pulmonol*, 2002. 33(1):32-37.
- Henriksson, M.L., C. Sundin, A.L. Jansson, A. Forsberg, R.H. Palmer, and B. Hallberg.** *Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo.* *Biochem J*, 2002. 367(Pt 3):617-628.
- Hensel, M., J.E. Shea, C. Gleeson, M.D. Jones, E. Dalton, and D.W. Holden.** *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection.* *Science*, 1995. 269(5222):400-403.
- Herz, J., R.C. Kowal, J.L. Goldstein, and M.S. Brown.** *Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment.* *EMBO J*, 1990. 9(6):1769-1776.
- Hobbs, M., E.S. Collie, P.D. Free, S.P. Livingston, and J.S. Mattick.** *PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa.* *Mol Microbiol*, 1993. 7(5):669-682.
- Hoffmann, I.M., B.K. Rubin, S.S. Iskandar, M.S. Schechter, S.K. Nagaraj, and M.M. Bitzan.** *Acute renal failure in cystic fibrosis: association with inhaled tobramycin therapy.* *Pediatr Pulmonol*, 2002. 34(5):375-377.
- Hogan, D.A. and R. Kolter.** *Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors.* *Science*, 2002. 296(5576):2229-2232.
- Hoiby, N., H. Krogh Johansen, C. Moser, Z. Song, O. Ciofu, and A. Kharazmi.** *Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth.* *Microbes Infect*, 2001. 3(1):23-35.
- Holloway, B.W.** *Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa.* *J Gen Microbiol*, 1955. 13(3):572-581.
- Holloway, B.W., J.B. Egan, and M. Monk.** *Lysogeny in Pseudomonas aeruginosa.* *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1960. 38:321-329.
- Hong, Y.Q. and B. Ghebrehiwet.** *Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3.* *Clin Immunol Immunopathol*, 1992. 62(2):133-138.
- Huang, I.H., P. Dwivedi, and H. Ton-That.** *Bacterial Pili and Fimbriae.* 2010.
- Iglewski, B.H. and D. Kabat.** *NAD-dependent inhibition of protein synthesis by Pseudomonas aeruginosa toxin.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(6):2284-2288.
- Iglewski, B.H. and J.C. Sadoff.** *Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of Pseudomonas aeruginosa toxin A.* *Methods Enzymol*, 1979. 60:780-793.
- Imler, J.L. and L. Zheng.** *Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals.* *J Leukoc Biol*, 2004. 75(1):18-26.
- Imundo, L., J. Barasch, A. Prince, and Q. Al-Awqati.** *Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(7):3019-3023.
- Jaeger, K.E.** *[Extracellular enzymes of Pseudomonas aeruginosa as virulence factors].* *Immun Infekt*, 1994. 22(5):177-180.

- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata.** *Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement).* *DNA Res*, 1996. 3(3):185-209.
- Karp, C.L., L.M. Flick, R. Yang, J. Uddin, and N.A. Petasis.** *Cystic fibrosis and lipoxins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. 73(3-4):263-270.
- Kerem, B., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L.C. Tsui.** *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.* *Science*, 1989. 245(4922):1073-1080.
- Khan, T.Z., J.S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F.J. Accurso, and D.W. Riches.** *Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.* *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 151(4):1075-1082.
- Kida, Y., Y. Higashimoto, H. Inoue, T. Shimizu, and K. Kuwano.** *A novel secreted protease from Pseudomonas aeruginosa activates NF-kappaB through protease-activated receptors.* *Cell Microbiol*, 2008. 10(7):1491-1504.
- Kiewitz, C. and B. Tummler.** *Sequence diversity of Pseudomonas aeruginosa: impact on population structure and genome evolution.* *J Bacteriol*, 2000. 182(11):3125-3135.
- Klipper-Aurbach, Y., M. Wasserman, N. Braunspiegel-Weintrob, D. Borstein, S. Peleg, S. Assa, M. Karp, Y. Benjamini, Y. Hochberg, and Z. Laron.** *Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus.* *Med Hypotheses*, 1995. 45(5):486-490.
- Klockgether, J., O. Reva, K. Larbig, and B. Tummler.** *Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of Pseudomonas aeruginosa C.* *J Bacteriol*, 2004. 186(2):518-534.
- Klockgether, J., D. Wurdemann, O. Reva, L. Wiehlmann, and B. Tummler.** *Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 2007. 189(6):2443-2459.
- Knowlton, R.G., O. Cohen-Haguener, N. Van Cong, J. Frezal, V.A. Brown, D. Barker, J.C. Braman, J.W. Schumm, L.C. Tsui, M. Buchwald, and et al.** *A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7.* *Nature*, 1985. 318(6044):380-382.
- Kohler, T., L.K. Curty, F. Barja, C. van Delden, and J.C. Pechere.** *Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili.* *J Bacteriol*, 2000. 182(21):5990-5996.
- Kohlmeier, J.E. and D.L. Woodland.** *Immunity to respiratory viruses.* *Annu Rev Immunol*, 2009. 27:61-82.
- Konstan, M.W., P.J. Byard, C.L. Hoppel, and P.B. Davis.** *Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis.* *N Engl J Med*, 1995. 332(13):848-854.
- Kooguchi, K., S. Hashimoto, A. Kobayashi, Y. Kitamura, I. Kudoh, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** *Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in Pseudomonas aeruginosa pneumonia.* *Infect Immun*, 1998. 66(7):3164-3169.

- Krall, R., J. Sun, K.J. Pederson, and J.T. Barbieri.** *In vivo rho GTPase-activating protein activity of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoS.* *Infect Immun*, 2002. 70(1):360-367.
- Kruger, E., E. Witt, S. Ohlmeier, R. Hanschke, and M. Hecker.** *The clp proteases of Bacillus subtilis are directly involved in degradation of misfolded proteins.* *J Bacteriol*, 2000. 182(11):3259-3265.
- Kube, D., U. Sontich, D. Fletcher, and P.B. Davis.** *Proinflammatory cytokine responses to P. aeruginosa infection in human airway epithelial cell lines.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(3):L493-502.
- Kukavica-Ibrulj, I., A. Bragonzi, M. Paroni, C. Winstanley, F. Sanschagrín, G.A. O'Toole, and R.C. Levesque.** *In vivo growth of Pseudomonas aeruginosa strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection.* *J Bacteriol*, 2008. 190(8):2804-2813.
- Kung, V.L., E.A. Ozer, and A.R. Hauser.** *The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa.* *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. 74(4):621-641.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S.C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C.V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N.M. Carter, S.K. Choi, J.J. Codani, I.F. Connerton, A. Danchin, and et al.** *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis.* *Nature*, 1997. 390(6657):249-256.
- Lamont, I.L., P.A. Beare, U. Ochsner, A.I. Vasil, and M.L. Vasil.** *Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10):7072-7077.
- Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski.** *A hierarchical quorum-sensing cascade in Pseudomonas aeruginosa links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS.* *Mol Microbiol*, 1996. 21(6):1137-1146.
- Laux, D.C., J.M. Corson, M. Givskov, M. Hentzer, A. Møller, K.A. Wosencroft, J.C. Olson, K.A. Krogh, J.B. Goldberg, and P.S. Cohen.** *Lysophosphatidic acid inhibition of the accumulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 alginate, pyoverdinin, elastase and LasA.* *Microbiology*, 2002. 148(Pt 6):1709-1723.
- Ledgham, F., I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J.N. Sturgis, and A. Lazdunski.** *Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of Pseudomonas aeruginosa LasR and RhlR.* *Mol Microbiol*, 2003. 48(1):199-210.
- Lee, D.G., J.M. Urbach, G. Wu, N.T. Liberati, R.L. Feinbaum, S. Miyata, L.T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L.G. Rahme, and F.M. Ausubel.** *Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial.* *Genome Biol*, 2006. 7(10):R90.
- Lee, K.K., H.B. Sheth, W.Y. Wong, R. Sherburne, W. Paranchych, R.S. Hodges, C.A. Lingwood, H. Krivan, and R.T. Irvin.** *The binding of Pseudomonas aeruginosa pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit.* *Mol Microbiol*, 1994. 11(4):705-713.
- Lehoux, D.E., F. Sanschagrín, and R.C. Levesque.** *Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria.* *Biotechniques*, 1999. 26(3):473-478, 480.

- Lehoux, D.E., F. Sanschagrín, and R.C. Levesque.** *Discovering essential and infection-related genes.* *Curr Opin Microbiol*, 2001. 4(5):515-519.
- Lehoux, D.E., F. Sanschagrín, and R.C. Levesque.** *Identification of in vivo essential genes from Pseudomonas aeruginosa by PCR-based signature-tagged mutagenesis.* *FEMS Microbiol Lett*, 2002. 210(1):73-80.
- Leid, J.G., C.J. Willson, M.E. Shirtliff, D.J. Hassett, M.R. Parsek, and A.K. Jeffers.** *The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing.* *J Immunol*, 2005. 175(11):7512-7518.
- Lentsch, A.B., T.P. Shanley, V. Sarma, and P.A. Ward.** *In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13.* *J Clin Invest*, 1997. 100(10):2443-2448.
- Lewis, D.A., A. Jones, J. Parkhill, D.P. Speert, J.R. Govan, J.J. Lipuma, S. Lory, A.K. Webb, and E. Mahenthalingam.** *Identification of DNA markers for a transmissible Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strain.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. 33(1):56-64.
- Liu, P.V.** *Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa.* *J Infect Dis*, 1974. 130 Suppl(0):S94-99.
- Lory, S. and M.S. Strom.** *Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of Pseudomonas aeruginosa--a review.* *Gene*, 1997. 192(1):117-121.
- Luberto, C., M.J. Stonehouse, E.A. Collins, N. Marchesini, S. El-Bawab, A.I. Vasil, M.L. Vasil, and Y.A. Hannun.** *Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from Pseudomonas aeruginosa. PlcH is a multifunctional enzyme.* *J Biol Chem*, 2003. 278(35):32733-32743.
- Luzar, M.A., M.J. Thomassen, and T.C. Montie.** *Flagella and motility alterations in Pseudomonas aeruginosa strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition.* *Infect Immun*, 1985. 50(2):577-582.
- Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier.** *Lung infections associated with cystic fibrosis.* *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(2):194-222.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M.R. Parsek, K. Bayles, and D.J. Wozniak.** *Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix.* *PLoS Pathog*, 2009. 5(3):e1000354.
- Mahenthalingam, E., M.E. Campbell, and D.P. Speert.** *Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis.* *Infect Immun*, 1994. 62(2):596-605.
- Mahenthalingam, E. and D.P. Speert.** *Nonopsonic phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum.* *Infect Immun*, 1995. 63(11):4519-4523.
- Marquart, M.E., A.R. Caballero, M. Chomnawang, B.A. Thibodeaux, S.S. Twining, and R.J. O'Callaghan.** *Identification of a novel secreted protease from Pseudomonas aeruginosa that causes corneal erosions.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. 46(10):3761-3768.
- Marquis, H., V. Doshi, and D.A. Portnoy.** *The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of Listeria monocytogenes from a primary vacuole in human epithelial cells.* *Infect Immun*, 1995. 63(11):4531-4534.
- Marshall, K.C.** *Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. Control of biofilm formation awaits the development of a method to prevent bacterial adhesion* *American Society for Microbiology* 1992. 58(4):202-207.

- Mathee, K., O. Ciofu, C. Sternberg, P.W. Lindum, J.I. Campbell, P. Jensen, A.H. Johnsen, M. Givskov, D.E. Ohman, S. Molin, N. Hoiby, and A. Kharazmi.** *Mucoid conversion of Pseudomonas aeruginosa by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung.* *Microbiology*, 1999. 145 (Pt 6):1349-1357.
- Mathee, K., G. Narasimhan, C. Valdes, X. Qiu, J.M. Matewish, M. Koehrsen, A. Rokas, C.N. Yandava, R. Engels, E. Zeng, R. Olavarietta, M. Doud, R.S. Smith, P. Montgomery, J.R. White, P.A. Godfrey, C. Kodira, B. Birren, J.E. Galagan, and S. Lory.** *Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(8):3100-3105.
- Mattick, J.S.** *Type IV pili and twitching motility.* *Annu Rev Microbiol*, 2002. 56:289-314.
- Mattick, J.S., C.B. Whitchurch, and R.A. Alm.** *The molecular genetics of type-4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa--a review.* *Gene*, 1996. 179(1):147-155.
- McCallum, S.J., M.J. Gallagher, J.E. Corkill, C.A. Hart, M.J. Ledson, and M.J. Walshaw.** *Spread of an epidemic Pseudomonas aeruginosa strain from a patient with cystic fibrosis (CF) to non-CF relatives.* *Thorax*, 2002. 57(6):559-560.
- McElvaney, N.G., H. Nakamura, P. Birrer, C.A. Hebert, W.L. Wong, M. Alphonso, J.B. Baker, M.A. Catalano, and R.G. Crystal.** *Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor.* *J Clin Invest*, 1992. 90(4):1296-1301.
- McGannon, C.M., C.A. Fuller, and A.A. Weiss.** *Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(9):3790-3798.
- McMorran, B., L. Town, E. Costelloe, J. Palmer, J. Engel, D. Hume, and B. Wainwright.** *Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to Pseudomonas aeruginosa infection.* *Infect Immun*, 2003. 71(10):6035-6044.
- Means, T.K., F. Hayashi, K.D. Smith, A. Aderem, and A.D. Luster.** *The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells.* *J Immunol*, 2003. 170(10):5165-5175.
- Mercanti, V., S.J. Charette, N. Bennett, J.J. Ryckewaert, F. Letourneur, and P. Cosson.** *Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups.* *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 19):4079-4087.
- Merz, A.J., M. So, and M.P. Sheetz.** *Pilus retraction powers bacterial twitching motility.* *Nature*, 2000. 407(6800):98-102.
- Meshulam, T., N. Obedeanu, D. Merzbach, and J.D. Sobel.** *Phagocytosis of mucoid and nonmucoid strains of Pseudomonas aeruginosa.* *Clin Immunol Immunopathol*, 1984. 32(2):151-165.
- Meyer, J.M., A. Neely, A. Stintzi, C. Georges, and I.A. Holder.** *Pyoverdinin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa.* *Infect Immun*, 1996. 64(2):518-523.
- Meyer, K.C. and J. Zimmerman.** *Neutrophil mediators, Pseudomonas, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis.* *J Lab Clin Med*, 1993. 121(5):654-661.
- Meyers, D.J. and R.S. Berk.** *Characterization of phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa as a potent inflammatory agent.* *Infect Immun*, 1990. 58(3):659-666.
- Miller, R.A. and B.E. Britigan.** *Role of oxidants in microbial pathophysiology.* *Clin Microbiol Rev*, 1997. 10(1):1-18.

- Montie, T.C., D. Doyle-Huntzinger, R.C. Craven, and I.A. Holder.** *Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of Pseudomonas aeruginosa in the burned-mouse model.* *Infect Immun*, 1982. 38(3):1296-1298.
- Morihara, K., H. Tsuzuki, T. Oka, H. Inoue, and M. Ebata.** *Pseudomonas Aeruginosa Elastase. Isolation, Crystallization, and Preliminary Characterization.* *J Biol Chem*, 1965. 240:3295-3304.
- Mulcahy, H., C.D. Sibley, M.G. Surette, and S. Lewenza.** *Drosophila melanogaster as an Animal Model for the Study of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections In Vivo.* *PLoS Pathog*, 2011. 7(10):e1002299.
- Naas, T., F. Namdari, P. Bogaerts, T.D. Huang, Y. Glupczynski, and P. Nordmann.** *Genetic structure associated with blaOXA-18, encoding a clavulanic acid-inhibited extended-spectrum oxacillinase.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(11):3898-3904.
- Nicas, T.I. and B.H. Iglewski.** *The contribution of exoproducts to virulence of Pseudomonas aeruginosa.* *Can J Microbiol*, 1985. 31(4):387-392.
- Nivens, D.E., D.E. Ohman, J. Williams, and M.J. Franklin.** *Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms.* *J Bacteriol*, 2001. 183(3):1047-1057.
- Norkina, O., S. Kaur, D. Ziemer, and R.C. De Lisle.** *Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286(6):G1032-1041.
- O'Carroll, M.R., M.W. Syrmis, C.E. Wainwright, R.M. Greer, P. Mitchell, C. Coulter, T.P. Sloots, M.D. Nissen, and S.C. Bell.** *Clonal strains of Pseudomonas aeruginosa in paediatric and adult cystic fibrosis units.* *Eur Respir J*, 2004. 24(1):101-106.
- O'Toole, G.A. and R. Kolter.** *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development.* *Mol Microbiol*, 1998a. 30(2):295-304.
- O'Toole, G.A. and R. Kolter.** *Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis.* *Mol Microbiol*, 1998b. 28(3):449-461.
- Ohkawa, I., S. Shiga, and M. Kageyama.** *An esterase on the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa for the hydrolysis of long chain acyl esters.* *J Biochem*, 1979. 86(3):643-656.
- Ostroff, R.M., A.I. Vasil, and M.L. Vasil.** *Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 1990. 172(10):5915-5923.
- Ostroff, R.M. and M.L. Vasil.** *Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 1987. 169(10):4597-4601.
- Parsek, M.R. and E.P. Greenberg.** *Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(16):8789-8793.
- Passador L, I.B.** *Quorum sensing and virulence gene regulation in Pseudomonas aeruginosa.* *Virulence mechanisms of bacterial pathogens.* 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995.65-78.
- Payne, S.M.** *Iron acquisition in microbial pathogenesis.* *Trends Microbiol*, 1993. 1(2):66-69.
- Pedersen, S.S., N. Hoiby, F. Espersen, and C. Koch.** *Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis.* *Thorax*, 1992. 47(1):6-13.

- Peters, J.E. and D.R. Galloway.** *Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from Pseudomonas aeruginosa: enhancement of elastase activity.* *J Bacteriol*, 1990. 172(5):2236-2240.
- Pier, G.B., F. Coleman, M. Grout, M. Franklin, and D.E. Ohman.** *Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid Pseudomonas aeruginosa to opsonic phagocytosis.* *Infect Immun*, 2001. 69(3):1895-1901.
- Potvin, E., D.E. Lehoux, I. Kukavica-Ibrulj, K.L. Richard, F. Sanschagrín, G.W. Lau, and R.C. Levesque.** *In vivo functional genomics of Pseudomonas aeruginosa for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets.* *Environ Microbiol*, 2003. 5(12):1294-1308.
- Pratha, V.S., D.L. Hogan, B.A. Martensson, J. Bernard, R. Zhou, and J.I. Isenberg.** *Identification of transport abnormalities in duodenal mucosa and duodenal enterocytes from patients with cystic fibrosis.* *Gastroenterology*, 2000. 118(6):1051-1060.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. Klein, D.A.** *Microbiologie 2e edition.* 2003.426-448.
- Pukatzki, S., R.H. Kessin, and J.J. Mekalanos.** *The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(5):3159-3164.
- R. Ruimy, A.A.** *Quorum-sensing chez Pseudomonas aeruginosa : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition.* *Réanimation*, 2004. 13:176-184.
- Rahme, L.G., E.J. Stevens, S.F. Wolfort, J. Shao, R.G. Tompkins, and F.M. Ausubel.** *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals.* *Science*, 1995. 268(5219):1899-1902.
- Ramsey, B.W., M.S. Pepe, J.M. Quan, K.L. Otto, A.B. Montgomery, J. Williams-Warren, K.M. Vasiljev, D. Borowitz, C.M. Bowman, B.C. Marshall, S. Marshall, and A.L. Smith.** *Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis.* *Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med*, 1999. 340(1):23-30.
- Rapport du Registre canadien de données sur les patients FK.** http://www.fibrosekystique.ca/assets/files/pdf/CPDR_ReportF.pdf. 2008.
- Ras, G.J., A.J. Theron, R. Anderson, G.W. Taylor, R. Wilson, P.J. Cole, and C.A. van der Merwe.** *Enhanced release of elastase and oxidative inactivation of alpha-1-protease inhibitor by stimulated human neutrophils exposed to Pseudomonas aeruginosa pigment 1-hydroxyphenazine.* *J Infect Dis*, 1992. 166(3):568-573.
- Rashid, M.H. and A. Kornberg.** *Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9):4885-4890.
- Ratjen, F.** *Treatment of early Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis.* *Curr Opin Pulm Med*, 2006. 12(6):428-432.
- Ratledge, C. and L.G. Dover.** *Iron metabolism in pathogenic bacteria.* *Annu Rev Microbiol*, 2000. 54:881-941.
- Remminghorst, U., I.D. Hay, and B.H. Rehm.** *Molecular characterization of Alg8, a putative glycosyltransferase, involved in alginate polymerisation.* *J Biotechnol*, 2009. 140(3-4):176-183.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, and et al.** *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.* *Science*, 1989. 245(4922):1066-1073.

- Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth.** *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.* *Bioinformatics*, 2010. 26(1):139-140.
- Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, and M. Foglino.** *Two-component systems in Pseudomonas aeruginosa: why so many?* *Trends Microbiol*, 2000. 8(11):498-504.
- Rosenfeld, M., B.W. Ramsey, and R.L. Gibson.** *Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management.* *Curr Opin Pulm Med*, 2003. 9(6):492-497.
- Roy, P.H., S.G. Tetu, A. Larouche, L. Elbourne, S. Tremblay, Q. Ren, R. Dodson, D. Harkins, R. Shay, K. Watkins, Y. Mahamoud, and I.T. Paulsen.** *Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier Pseudomonas aeruginosa PA7.* *PLoS One*, 2010. 5(1):e8842.
- Rubenstein, R.C., M.E. Egan, and P.L. Zeitlin.** *In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR.* *J Clin Invest*, 1997. 100(10):2457-2465.
- Rubenstein, R.C. and P.L. Zeitlin.** *A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function.* *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(2):484-490.
- Saiman, L., B.C. Marshall, N. Mayer-Hamblett, J.L. Burns, A.L. Quittner, D.A. Cibene, S. Coquillet, A.Y. Fieberg, F.J. Accurso, and P.W. Campbell, 3rd.** *Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial.* *JAMA*, 2003. 290(13):1749-1756.
- Saiman, L. and A. Prince.** *Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells.* *J Clin Invest*, 1993. 92(4):1875-1880.
- Salunkhe, P., C.H. Smart, J.A. Morgan, S. Panagea, M.J. Walshaw, C.A. Hart, R. Geffers, B. Tummler, and C. Winstanley.** *A cystic fibrosis epidemic strain of Pseudomonas aeruginosa displays enhanced virulence and antimicrobial resistance.* *J Bacteriol*, 2005. 187(14):4908-4920.
- Sambrook, J.R., D. W. .** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edn Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.*, 2001.
- Sanschagrin, F., I. Kukavica-Ibrulj, and R.C. Levesque.** *Essential genes in the infection model of Pseudomonas aeruginosa PCR-based signature-tagged mutagenesis.* *Methods Mol Biol*, 2008. 416:61-82.
- Sato, H., D.W. Frank, C.J. Hillard, J.B. Feix, R.R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R.M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** *The mechanism of action of the Pseudomonas aeruginosa-encoded type III cytotoxin, ExoU.* *EMBO J*, 2003. 22(12):2959-2969.
- Schaber, J.A., N.L. Carty, N.A. McDonald, E.D. Graham, R. Cheluvappa, J.A. Griswold, and A.N. Hamood.** *Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.* *J Med Microbiol*, 2004. 53(Pt 9):841-853.
- Schottelius, A.J., M.W. Mayo, R.B. Sartor, and A.S. Baldwin, Jr.** *Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding.* *J Biol Chem*, 1999. 274(45):31868-31874.

- Scott, F.W. and T.L. Pitt.** *Identification and characterization of transmissible Pseudomonas aeruginosa strains in cystic fibrosis patients in England and Wales.* *J Med Microbiol*, 2004. 53(Pt 7):609-615.
- Sherman, P., N. Fleming, J. Forstner, N. Roomi, and G. Forstner.** *Bacteria and the mucus blanket in experimental small bowel bacterial overgrowth.* *Am J Pathol*, 1987. 126(3):527-534.
- Sibley, C.D., K. Duan, C. Fischer, M.D. Parkins, D.G. Storey, H.R. Rabin, and M.G. Surette.** *Discerning the complexity of community interactions using a Drosophila model of polymicrobial infections.* *PLoS Pathog*, 2008. 4(10):e1000184.
- Sitkiewicz, I., K.E. Stockbauer, and J.M. Musser.** *Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis.* *Trends Microbiol*, 2007. 15(2):63-69.
- Smith, E.E., E.H. Sims, D.H. Spencer, R. Kaul, and M.V. Olson.** *Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 2005. 187(6):2138-2147.
- Smith, G.A., H. Marquis, S. Jones, N.C. Johnston, D.A. Portnoy, and H. Goldfine.** *The two distinct phospholipases C of Listeria monocytogenes have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread.* *Infect Immun*, 1995. 63(11):4231-4237.
- Smith, J.J., S.M. Travis, E.P. Greenberg, and M.J. Welsh.** *Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid.* *Cell*, 1996. 85(2):229-236.
- Smith, M.F., Jr., A. Mitchell, G. Li, S. Ding, A.M. Fitzmaurice, K. Ryan, S. Crowe, and J.B. Goldberg.** *Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells.* *J Biol Chem*, 2003. 278(35):32552-32560.
- Sokol, R.J. and P.R. Durie.** *Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis.* *Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999. 28 Suppl 1:S1-13.
- Stanke, F., C. Davenport, S. Hedtfeld, and B. Tummler.** *Differential decay of parent-of-origin-specific genomic sharing in cystic fibrosis-affected sib pairs maps a paternally imprinted locus to 7q34.* *Eur J Hum Genet*, 2010. 18(5):553-559.
- Stecenko, A.A., G. King, K. Torii, R.M. Breyer, R. Dworski, T.S. Blackwell, J.W. Christman, and K.L. Brigham.** *Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells.* *Inflammation*, 2001. 25(3):145-155.
- Stewart, P.S.** *Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(11):2517-2522.
- Stonehouse, M.J., A. Cota-Gomez, S.K. Parker, W.E. Martin, J.A. Hankin, R.C. Murphy, W. Chen, K.B. Lim, M. Hackett, A.I. Vasil, and M.L. Vasil.** *A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C.* *Mol Microbiol*, 2002. 46(3):661-676.
- Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory, and M.V. Olson.** *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen.* *Nature*, 2000. 406(6799):959-964.
- Strom, M.S. and S. Lory.** *Structure-function and biogenesis of the type IV pili.* *Annu Rev Microbiol*, 1993. 47:565-596.

- Stuer, W., K.E. Jaeger, and U.K. Winkler.** *Purification of extracellular lipase from Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 1986. 168(3):1070-1074.
- Tager, A.M., J. Wu, and M.W. Vermeulen.** *The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. 19(4):643-652.
- Takase, H., H. Nitani, K. Hoshino, and T. Otani.** *Impact of siderophore production on Pseudomonas aeruginosa infections in immunosuppressed mice.* *Infect Immun*, 2000. 68(4):1834-1839.
- Tang, A., M.E. Marquart, J.D. Fratkin, C.C. McCormick, A.R. Caballero, H.P. Gatlin, and R.J. O'Callaghan.** *Properties of PASP: a Pseudomonas protease capable of mediating corneal erosions.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(8):3794-3801.
- Thanassi, D.G. and S.J. Hultgren.** *Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system.* *Methods*, 2000. 20(1):111-126.
- The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium.** *Cystic Fibrosis Mutation Data Base* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). accessed May 3, 2011.
- Tims, S., W. van Wamel, H.P. Endtz, A. van Belkum, and M. Kayser.** *Microbial DNA fingerprinting of human fingerprints: dynamic colonization of fingertip microflora challenges human host inferences for forensic purposes.* *Int J Legal Med*, 2010. 124(5):477-481.
- Tormo-Mas, M.A., I. Mir, A. Shrestha, S.M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbe, R.P. Novick, G.E. Christie, and J.R. Penades.** *Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands.* *Nature*, 2010. 465(7299):779-782.
- Treggiari, M.M., M. Rosenfeld, G. Retsch-Bogart, R. Gibson, and B. Ramsey.** *Approach to eradication of initial Pseudomonas aeruginosa infection in children with cystic fibrosis.* *Pediatr Pulmonol*, 2007. 42(9):751-756.
- United Kingdom Database.** *Cystic Fibrosis Trusts*, <http://www.cystic-fibrosis.org.uk/>. accessed June 15th, 2011.
- Vaca-Pacheco, S., G.L. Paniagua-Contreras, O. Garcia-Gonzalez, and M. de la Garza.** *The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in Pseudomonas aeruginosa PAO1.* *Curr Microbiol*, 1999. 38(4):239-243.
- Vallet, I., J.W. Olson, S. Lory, A. Lazdunski, and A. Filloux.** *The chaperone/usher pathways of Pseudomonas aeruginosa: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12):6911-6916.
- Vallis, A.J., V. Finck-Barbancon, T.L. Yahr, and D.W. Frank.** *Biological effects of Pseudomonas aeruginosa type III-secreted proteins on CHO cells.* *Infect Immun*, 1999. 67(4):2040-2044.
- Van Delden, C. and B.H. Iglewski.** *Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections.* *Emerg Infect Dis*, 1998. 4(4):551-560.
- Venkatakrishnan, A., A.A. Stecenko, G. King, T.R. Blackwell, K.L. Brigham, J.W. Christman, and T.S. Blackwell.** *Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. 23(3):396-403.
- Wahle, E., R.S. Lasken, and A. Kornberg.** *The dnaB-dnaC replication protein complex of Escherichia coli. II. Role of the complex in mobilizing dnaB functions.* *J Biol Chem*, 1989. 264(5):2469-2475.

- Wainwright, B.J., P.J. Scambler, J. Schmidtke, E.A. Watson, H.Y. Law, M. Farrall, H.J. Cooke, H. Eiberg, and R. Williamson.** *Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22.* *Nature*, 1985. 318(6044):384-385.
- Wall, D. and D. Kaiser.** *Type IV pili and cell motility.* *Mol Microbiol*, 1999. 32(1):1-10.
- Walters, R.W., T. Grunst, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, M.J. Welsh, and J. Zabner.** *Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia.* *J Biol Chem*, 1999. 274(15):10219-10226.
- Webb, J.S., M. Lau, and S. Kjelleberg.** *Bacteriophage and phenotypic variation in Pseudomonas aeruginosa biofilm development.* *J Bacteriol*, 2004. 186(23):8066-8073.
- Weber, A.J., G. Soong, R. Bryan, S. Saba, and A. Prince.** *Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 281(1):L71-78.
- Wellhauser, L., P. Kim Chiaw, S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh, and C.E. Bear.** *A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability.* *Mol Pharmacol*, 2009. 75(6):1430-1438.
- Welsh, M.J. and A.E. Smith.** *Cystic fibrosis.* *Sci Am*, 1995. 273(6):52-59.
- Whitchurch, C.B., R.A. Alm, and J.S. Mattick.** *The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in Pseudomonas aeruginosa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(18):9839-9843.
- Whitchurch, C.B., A.J. Leech, M.D. Young, D. Kennedy, J.L. Sargent, J.J. Bertrand, A.B. Semmler, A.S. Mellick, P.R. Martin, R.A. Alm, M. Hobbs, S.A. Beatson, B. Huang, L. Nguyen, J.C. Commoli, J.N. Engel, A. Darzins, and J.S. Mattick.** *Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in Pseudomonas aeruginosa.* *Mol Microbiol*, 2004. 52(3):873-893.
- Wick, M.J., A.N. Hamood, and B.H. Iglewski.** *Analysis of the structure-function relationship of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A.* *Mol Microbiol*, 1990. 4(4):527-535.
- Wickner, S. and J. Hurwitz.** *Interaction of Escherichia coli dnaB and dnaC(D) gene products in vitro.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(3):921-925.
- Wilhelm, S., A. Gdynia, P. Tielen, F. Rosenau, and K.E. Jaeger.** *The autotransporter esterase EstA of Pseudomonas aeruginosa is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation.* *J Bacteriol*, 2007. 189(18):6695-6703.
- Wilhelm, S., J. Tommassen, and K.E. Jaeger.** *A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa.* *J Bacteriol*, 1999. 181(22):6977-6986.
- Williams, K.P.** *Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies.* *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(4):866-875.
- Winstanley, C., M.G. Langille, J.L. Fothergill, I. Kukavica-Ibrulj, C. Paradis-Bleau, F. Sanschagrin, N.R. Thomson, G.L. Winsor, M.A. Quail, N. Lennard, A. Bignell, L. Clarke, K. Seeger, D. Saunders, D. Harris, J. Parkhill, R.E. Hancock, F.S. Brinkman, and R.C. Levesque.** *Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of Pseudomonas aeruginosa.* *Genome Res*, 2009. 19(1):12-23.
- Wolfgang, M.C., B.R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C.G. Miyada, and S. Lory.** *Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14):8484-8489.

Woods, D.E. and B.H. Iglewski. *Toxins of Pseudomonas aeruginosa: new perspectives.* *Rev Infect Dis*, 1983. 5 Suppl 4:S715-722.

Wurdemann, D. and B. Tummler. *In silico comparison of pKLC102-like genomic islands of Pseudomonas aeruginosa.* *FEMS Microbiol Lett*, 2007. 275(2):244-249.

Yonekura, K., S. Maki, D.G. Morgan, D.J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, and K. Namba. *The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly.* *Science*, 2000. 290(5499):2148-2152.

Annexe

Annexe A : Présentation au Congrès conjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, 2010

Identification and Characterization of Essential Genes from *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 Involved in Chronic Pulmonary Infection

A-A. Lemieux¹, I. Kukavica-Ibrulj¹, J.L. Fothergill², C. Winstanley², S.J. Charette¹, G. Fillion¹ and R.C. Levesque¹

¹Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, ²Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

Pseudomonas aeruginosa is the most common cause of persistent pulmonary infection in cystic fibrosis (CF) patients. A newly hypervirulent strain, the Liverpool Epidemic Strain (LES), is associated with high transmissibility to CF and non-CF patients, increased morbidity and mortality and antibiotic multi-resistance.

Supplementary genes in the hypervirulent LESB58 strain could be directly implicated in initiation and establishment of the pulmonary infection. The goal of our search is to find the genetics targets in those regions and develop novel antibiotics.

From a signature-tagged mutagenesis (STM) library of *P. aeruginosa* LESB58 mutants screened in a rat lung model of chronic infection, 162 were defective for *in vivo* maintenance. We confirmed that 12 STM mutants had a mutation in mobile genetic elements. Attenuation of virulence was measured *in vivo* using competitive index (CI) analysis in the chronic lung infection rat model and in *Dictyostelium discoideum* amoeba. Additional studies of defects in bacterial virulence were focused on 2 STM mutants, one defective in a DNA replication of protein DnaC and the other in a putative portal phage protein. Transcriptional studies by qPCR revealed decreased levels of expression for DnaC and a constant variation in expression for putative portal protein. Whole genome transcriptome analyses will identify all gene products affected by these mutations and their impact on *in vivo* virulence. Comparison of phage production between the LES wild type strain and the 2 mutants showed a reduced amount of phage production in both mutant strains. Construction of gene knockout strains will also confirm these results.

- Communication présentée au Congrès conjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, Montréal, Qc, Canada, Novembre 2010

Annexe B : Présentation à la Journée de la recherche en médecine, 2011

Génomique microbienne fonctionnelle de gènes essentiels à l'infection pulmonaire chronique par *Pseudomonas aeruginosa*

A-A. Lemieux¹, I. Kukavica-Ibrulj¹, J.L. Fothergill², C. Winstanley² et R.C. Levesque¹

¹Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, ²Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

BACKGROUND : Les infections pulmonaires chroniques causées par la souche *P. aeruginosa* LESB58 représentent un problème majeur d'hypervirulence dû à leur résistance élevée à la plupart des antibiotiques. Des études épidémiologiques récentes en Angleterre et au Canada démontrent le rôle important de ce type de souches chez des personnes atteintes de fibrose kystique (FK) et les immunodéprimés. Des analyses génomiques de LESB58 effectuées dans notre laboratoire ont identifié des insertions de 11 fragments d'ADN supplémentaires, soit 6 prophages et 5 îlots génomiques, totalisant plus de 500 kilobases. Ces régions sont présumées responsables de nouveaux phénotypes dont la virulence accrue.

OBJECTIF : L'hypervirulence et les nouveaux phénotypes de la souche de *P. aeruginosa* LESB58, sont en lien directe avec ces fragments d'ADN supplémentaires dans le génome. Au cours de cette étude, nous tentons de déterminer les fonctions des gènes associés à ces fragments et leur implication dans la pathogénie bactérienne accrue.

MÉTHODES : Une mutagenèse à étiquette signature (STM) de LESB58 suivi d'un indice de compétition (CI) ont été réalisés permettant d'identifier 163 gènes essentiels au maintien de l'infection. Douze (12) de ces gènes sont situés dans des îlots de pathogénie et des prophages. L'analyse du niveau d'expression des gènes et des transcriptomes de la souche sauvage et d'un mutant STM défectueux *in vivo* ont été réalisées par séquençage à haut débit GS FLX 454. L'analyse transcriptomique comparative et le qPCR ont permis d'observer des changements d'expression pour certains gènes et la diminution de la virulence. La construction de mutants de délétion chez *P. aeruginosa* pour ces gènes et des analyses de compétition lors d'une infection pulmonaire chronique confirment l'importance de ces protéines *in vivo* chez le rat.

RÉSULTATS : La STM et la CI démontrent que deux mutants de *P. aeruginosa* LESB58 ayant une insertion dans les îlots génomiques prophages 2 et 3 sont incapables de causer

une infection pulmonaire chronique. Il s'agit d'une DnaC et d'une protéine 'putative portal'. La production spontanée de particules phagiques pour ces deux mutants est significativement diminuée suggérant fortement l'implication de ces protéines dans l'hypervirulence. L'analyse du transcriptome confirme une variation élevée dans le niveau d'expression de plusieurs gènes, notamment les gènes impliqués dans la réponse SOS, de choc thermique et de la réplication et la division cellulaire.

CONCLUSION : Les mutants STM possédant une insertion dans la protéine DnaC et la protéine 'Putative portal' des îlots génomiques 2 et 3 sont incapables d'établir l'infection pulmonaire chronique chez le rat. L'identification d'inhibiteurs de DnaC et de la protéine de transport ouvre la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

- Communication présentée à la Journée de la recherche de la recherche en médecine, Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, mai 2011.

Annexe C : Présentation au 13th International Pseudomonas Meeting, 2011

Essential Genes from the Epidemic *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 Accessory Genome Involved in Chronic Pulmonary Infection

A-A. Lemieux¹, I. Kukavica-Ibrulj¹, B. Boyle¹, J. L. Fothergill², G. Filion¹, V. Dekimpe³, C. Winstanley², S. J. Charette¹, E. Déziel³ and R. C. Levesque¹

¹Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, ²Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, ³INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Pseudomonas aeruginosa causes persistent pulmonary infection in cystic fibrosis (CF) patients. A strain of *P. aeruginosa* highly resistant to antibiotics, the Liverpool Epidemic Strain (LES), is associated with high transmissibility causing increased morbidity and mortality. The LESB58 6.7 Mb genome contains 6 prophages (PPs) and 5 genomic islands (GI) encoding 455 additional genes compared to PAO1; with several implicated in chronic pulmonary infection. We constructed a PCR-based signature-tagged mutagenesis (STM) library of 9216 LESB58 mutants and several rounds of screening were performed in a rat model of chronic lung infection. After 7 days postinfection, 163 were retained as defective for *in vivo* maintenance. We selected 12 STM mutants with insertions in GIs or PPs. Attenuation *in vivo* was measured using the competitive index (CI) in the rat model. A defect in maintenance was confirmed by CI values between 100- and 1000-fold lower than the wild-type. *In vivo* screening done in the amoeba *Dictyostelium discoideum* confirmed that 9 of the 12 STM mutants had a diminished virulence; on the other hand, the assay in the fly *Drosophila melanogaster* identified STM mutants with defects mostly in metabolic pathways. Additional studies focused on 2 STM mutants in PPs, one defective in a DNA replication protein DnaC, and one in a putative portal phage protein. Phenotypic analysis showed differences between LESB58 and mutants. Transcriptional studies by qPCR confirmed decreased levels of expression for DnaC and variations in expression levels for putative portal protein. Whole transcriptome RNA-Seq profiling of the *dnaC* mutant identified down-regulated genes such as transcriptional regulators, known virulence factors and up-regulated ribosomal proteins and replication. Comparison of phage production between wild type strain and mutants showed reduced phage production in both mutants. Inability of these STM mutants to establish and maintain pulmonary infection in rat model combined with reduced amount of phage production strongly suggest their involvement in LESB58 hypervirulence.

- Communication présentée au 13th International Pseudomonas meeting, Sydney, Australie, septembre 2011.

Annexe D : Présentation au Congrès de Bactériologie intégrative : Symbiose et Pathogenèse (BiSP), 2011

Génomique fonctionnelle des gènes essentielles à l'infection pulmonaire chronique et unique chez la souche épidémique *Pseudomonas aeruginosa* LESB58

A-A. Lemieux¹, I. Kukavica-Ibrulj¹, B. Boyle¹, J. L. Fothergill², G. Filion¹, V. Dekimpe³, C. Winstanley², S. J. Charette¹, E. Déziel³ and R. C. Levesque¹

¹Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, ²Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, ³INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique. Une nouvelle souche épidémique clonale multiresistante aux antibiotiques, LESB58, présente un comportement agressif et hypervirulent. Le génome de LESB58 est composé d'une région hautement conservée (90%) et de 455 gènes uniques supplémentaires. Ces gènes supplémentaires forment 5 îlots génomiques (GIs) et 6 prophages (PPs) et nous proposons que ces éléments génétiques spécifiques à LESB58 soient en lien direct avec son hypervirulence. Au cours de cette étude, nous tenterons de déterminer l'impact de ces régions dans la virulence et la pathogénie de LESB58. Une mutagenèse à étiquette signature (STM) a été réalisée donnant accès à une collection de 9216 mutants uniques et identifiables par PCR. Un criblage *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire chez le rat a permis de retenir 163 mutants défectueux pour le maintien de l'infection *in vivo*. Le séquençage et l'analyse bio-informatique de ces 163 mutants a révélé que 12 d'entre eux possédaient une insertion dans un GI ou un PP. Des indices de compétition (CI) ont démontré que les 12 mutants possédaient une virulence diminuée *in vivo* variant de 100 à 1000 fois plus faible que le type sauvage. Des analyses dans l'amibe et la drosophile ont permis de confirmer l'atténuation de la virulence pour quelques-uns des mutants. Des analyses plus poussées sur deux mutants, une 'DnaC' et une protéine portale, se trouvant dans les PPs 2 et 3 respectivement, ont démontré une diminution de la quantité de phages spontanés produits. Le transcriptome complet du mutant DnaC a été réalisé sur NGS-454 et a démontré la surexpression de 172 gènes, majoritairement impliqués dans la transcription, la régulation post-transcriptionnelle et la réplication. L'incapacité des mutants STM à établir l'infection et leur faible production de phage suggèrent l'implication des PPs dans l'hypervirulence.

- Communication présentée au Congrès de Bactériologie intégrative : Symbiose et Pathogenèse (BiSP), université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, Novembre 2011.

Annexe E : Présentation au Congrès conjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, 2011

Génomique fonctionnelle des gènes essentiels à l'infection pulmonaire chronique et unique chez la souche épidémique *Pseudomonas aeruginosa* LESB58

A-A. Lemieux¹, I. Kukavica-Ibrulj¹, B. Boyle¹, J. L. Fothergill², G. Filion¹, V. Dekimpe³, C. Winstanley², S. J. Charette¹, E. Déziel³ and R. C. Levesque¹

¹Université Laval, Ste-Foy, Qc, Canada, ²Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, ³INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Contexte: *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique. Une nouvelle souche épidémique multiresistante aux antibiotiques, LESB58, présente un comportement agressif et hypervirulent. Le génome de LESB58 est composé d'une région hautement conservée (90%) et de 455 gènes uniques supplémentaires formant 5 îlots génomiques (GIs) et 6 prophages (PPs).

Hypothèse et objectif: Nous proposons que ces éléments génétiques spécifiques à LESB58 soient en lien direct avec son hypervirulence. Au cours de cette étude, nous tenterons de déterminer l'impact de ces régions dans la virulence et la pathogénie de LESB58.

Méthode et résultats: Une mutagenèse à étiquette signature (STM) a été réalisée donnant accès à une collection de 9216 mutants uniques et identifiables par PCR. Un criblage *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire chez le rat a permis de retenir 163 mutants défectueux pour le maintien de l'infection *in vivo*. Le séquençage et l'analyse bio-informatique de ces 163 mutants a révélé que 12 d'entre eux possédaient une insertion dans un GI ou un PP. Des indices de compétition (CI) ont démontré que les 12 mutants possédaient une virulence diminuée *in vivo* variant de 100 à 1000 fois plus faible que le

type sauvage. Des analyses dans l'amibe et la drosophile ont permis de confirmer l'atténuation de la virulence pour quelques-uns des mutants. Des analyses plus poussées sur deux mutants, une 'DnaC' et une protéine portale, se trouvant dans les PPs 2 et 3 respectivement, ont démontré une diminution de la quantité de phages spontanés produits. Le transcriptome complet du mutant DnaC a été réalisé sur NGS-454 et a démontré la surexpression de 172 gènes, majoritairement impliqués dans la transcription et la régulation post-transcriptionnelle. L'incapacité des mutants STM à établir l'infection et leur faible production de phage suggèrent l'implication des PPs dans l'hypervirulence

- Communication présentée au Congrès conjoint de l'association des pneumologues de la province de Québec et du Réseau en santé respiratoire du FRSQ, Montréal, Qc, Canada, Novembre 2011.