

CARACTÉRISATION D'INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE
P. AERUGINOSA ET *S. AUREUS* CO-ISOLÉS D'INFECTIONS RESPIRATOIRES
CHRONIQUES CHEZ LES PATIENTS ADULTES ATTEINTS
DE FIBROSE KYSTIQUE

par

Alexandre Fugère

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

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, le 20 mai 2014

Le 20 mai 2014

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Alexandre Fugère
ds sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin
Directeur de recherche
Département de Biologie

Professeur André Cantin
Codirecteur de recherche
Département de Médecine

Professeur Eric Frost
Membre interne
Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de Biologie

Sommaire

La fibrose kystique est une maladie autosomale récessive multisystémique se manifestant principalement au niveau du système respiratoire et digestif. En raison d'une altération de la protéine régulatrice CFTR, l'équilibre ionique chez les cellules de l'hôte est déficient. Il en résulte, entre autres, une sécrétion et une accumulation d'un mucus pulmonaire très consistant. L'évacuation du mucus étant très fastidieuse chez les patients atteints de fibrose kystique, l'élimination des particules et bactéries des voies respiratoires est inadéquate. Cet aspect de la maladie participe grandement à sa progression, car l'établissement d'infections bactériennes chroniques contribue principalement à l'effet délétère sur la santé respiratoire des patients atteints de fibrose kystique.

La colonisation du mucus pulmonaire par les bactéries pathogènes est le sujet de nombreuses recherches extensives dans le contexte de la fibrose kystique. La présence d'une diversité microbienne dans les voies respiratoires est connue depuis longtemps, mais avec les techniques récentes d'analyse moléculaire, il a été constaté que celle-ci peut présenter une très grande richesse qui était préalablement non détectée par les méthodes d'isolement classiques. Les interactions et comportements adoptés par les populations polymicrobiennes du microbiome FK dans la progression de la maladie sont maintenant de grand intérêt. La virulence des principaux pathogènes en FK a préalablement et exhaustivement été décrite de façon spécifique. Parmi les plus notoires, comme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*, certains utilisent des systèmes de communication cellulaire élaborés («quorum sensing») dans le but de réguler leur virulence.

De nouvelles voies de recherche sont construites sur la suggestion qu'une population polymicrobienne peut être perçue comme un seul agent infectieux. Notre étude a été conduite afin de documenter les possibles réponses interspèces entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* suite à l'échange de molécules sécrétées dans le cadre du «quorum sensing». Pour ce faire, nous avons caractérisé un éventail d'interactions existantes entre des isolats cliniques des deux pathogènes d'intérêt. Nous avons également développé un modèle nous permettant de mieux comprendre l'impact de la coexistence sur leur pathogénèse. Inévitablement, l'étude vise à définir l'instance de la présence simultanée des deux bactéries dans l'établissement d'infections chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique ainsi que sur leur santé respiratoire.

Cette étude tente ultimement de contribuer à l'effort visant à comprendre l'importance des interactions polymicrobiennes dans un contexte infectieux dans le but de trouver de nouveaux indices quant à l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à mon directeur de recherche, François Malouin, qui a agi à titre de mentor tout au long de mon cheminement de maîtrise et dont les conseils judicieux seront appliqués durant la continuation de ma carrière professionnelle et dans la création de nouveaux réseaux de contacts.

Sans contredit, une importante partie du travail effectué durant ce projet de maîtrise a été effectuée aux côtés de David Lalonde Séguin et Gabriel Mitchell, qui tous deux sont devenus, plus des collègues hors pairs, des amis exemplaires.

Je remercie Mickael Audette d'avoir accepté un mandat de stage sur le projet de ma maîtrise et d'avoir contribué, avec une si grande importance, à la complétion du travail de laboratoire.

À tous mes amis et collègues, qui m'ont épaulé et encouragé durant la totalité de mes études. Un merci tout spécial aux biologistes des promotions 47 et 48 du baccalauréat en biologie de l'Université de Sherbrooke d'avoir confirmé mes années universitaires comme des plus mémorables.

Enfin, merci à mes parents pour leur soutien sans relâche et constant depuis les 27 dernières années, autant dans mon parcours étudiant que dans ma vie privée.

Table des matières

Sommaire	iii
Remerciements	v
Table des matières	vi
Liste des abréviations	ix
Liste de figures	x
Liste de tables	xii
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 La fibrose kystique et les infections pulmonaires	1
1.2 Flore normale et flore associée à la fibrose kystique	2
1.3 Interactions inter-espèces du microbiome FK	5
1.4 Traitements thérapeutiques contre les populations microbiennes	7
1.5 Biofilm polymicrobien dans les infections chroniques	9
1.6 Adaptation des populations polymicrobiennes au poumon de l'hôte	11
1.7 Modulation et évasion du système immunitaire de l'hôte	13
1.8 Contexte, hypothèse et objectifs de recherche	14
Chapitre 2 : Article I	16
2.1 Introduction de l'article I	16
2.2 TITLE PAGE	17
2.3 ABSTRACT	18

2.4	INTRODUCTION	19
2.5	MATERIALS AND METHODS	21
2.5.1	Ethics statement	21
2.5.2	Bacterial strains, media and growth conditions.	21
2.5.3	Clinical isolates	22
2.5.4	Collection of clinical data	23
2.5.5	<i>P. aeruginosa</i> culture supernatant preparation	24
2.5.6	Pyocyanin extraction and quantification	24
2.5.7	2-alkyl-4-(1 <i>H</i>)-quinolones (AQs) and <i>N</i> -acyl-homoserines lactones (AHL) extractions	25
2.5.8	LC/MS analyses	25
2.5.9	Biofilm formation	26
2.5.10	Statistics	26
2.6	RESULTS	27
2.6.1	Clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i> trigger a wide range of biofilm formation responses in <i>S. aureus</i>	27
2.6.2	<i>S. aureus</i> biofilm stimulation by <i>P. aeruginosa</i> is associated with PQS and HQNO production	31
2.6.3	<i>P. aeruginosa</i> strains do not stimulate biofilm formation of co-isolated <i>S. aureus</i> strains	36
2.6.4	Effect of co-colonization on FEV1	39

2.7	DISCUSSION	41
2.8	ACKNOWLEDGEMENTS	45
2.9	REFERENCES	46
Chapitre 3		53
3.1	Établissement d'un biofilm mixte combinant <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	53
3.2	Caractérisation des suivis de coexistence en biofilm mixte de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	55
3.3	Émergence de morphotypes séquentiels durant les passages en biofilm mixte	58
3.4	Caractérisation de virulence des isolats séquentiels de <i>P. aeruginosa</i>	61
Chapitre 4 : Discussion		64
Chapitre 5 : Conclusion		71
Bibliographie		72

Liste des abréviations

AHL	<i>N</i> -acyl-Homoserine lactones
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second
FK	Fibrose kystique
HHQ	2-heptyl-4-hydroxyquinoline
HQNO	4-hydroxy-2n-heptylquinolone- <i>N</i> -oxide
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PQS	Pseudomonal Quinolone Signal
QS	Quorum Sensing
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RSCV	Rugose Small Colony Variant
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	Small Colony Variant
SMG	<i>Streptococcus milleri</i> Group
UFC	Unité Formatrice de Colonie

Liste de figures

1.	<i>S. aureus</i> biofilm stimulation by clinical <i>P. aeruginosa</i> supernatants.	29
S1.	<i>S. aureus</i> CF1A-L biofilm production in response to the culture supernatant of <i>P. aeruginosa</i> PA14.	30
2.	<i>P. aeruginosa</i> exoproducts associated with <i>S. aureus</i> biofilm stimulation.	32
S2	Biofilm increase in function of signal molecules and pyocyanin production	34
3.	HQNO confirmed as main component in <i>S. aureus</i> biofilm stimulation.	35
4.	Altered response of co-isolated strains.	38
5	Health condition of co-colonized patients.	40
3.1	Suivi de la population bactérienne de <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> après 24h de croissance en biofilm mixte suite aux passages séquentiels.	58
3.2	Quantification des phénotypes de croissance mucoïde et non mucoïde observés chez <i>P. aeruginosa</i> au cours des passages du suivi #1	60

3.3	Production de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> PA14 après 20 passages en biofilm en monoculture et mixte avec <i>S. aureus</i> CF07L	63
4.1	Regroupement des isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i> selon leur effet inhibiteur sur la croissance de <i>S. aureus</i> CF1AL relativement à leur capacité à stimuler le biofilm ou l'expression de facteurs de virulence.	69

Liste de tables

Table 1	<i>P. aeruginosa</i> reference and mutant strains.	27
Table 4.1	Caractéristiques des isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i> et PA14. 66	

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La fibrose kystique et les infections pulmonaires

La fibrose kystique (FK) est une maladie autosomale récessive dont la principale cause de mortalité chez les patients est attribuable au développement de défaillances respiratoires progressives (Zemanick 2011). La détérioration des voies pulmonaires est causée notamment par l'inflammation associée aux infections bactériennes chroniques qui s'y établissent. Étant donné leur forte prévalence ou leur virulence accrue, l'intérêt scientifique s'est principalement focalisé sur des espèces comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Burkholderia cepacia* (Beck 2012; CysticFibrosisCanada 2011). Ceci étant dit, on sait que les poumons des patients FK abritent une flore importante composée de nombreux organismes différents. La composition du microbiome pulmonaire est un sujet de plus en plus discuté et son rôle dans le développement d'infections est devenu préoccupant. Les flores bactériennes pulmonaires étaient la plupart du temps associées aux maladies respiratoires. Cependant, on a dernièrement prouvé que les poumons de personnes saines, longtemps crus stériles, étaient aussi colonisés par des bactéries (Beck 2012). Il devient donc d'une importance capitale d'effectuer une comparaison exhaustive des flores respiratoires d'humains sains et des flores infectieuses liées aux dysfonctions respiratoires comme la fibrose kystique (Lipuma 2010).

1.2 Flore normale et flore associée à la fibrose kystique

Il a longtemps été soutenu dans la communauté scientifique que les poumons de personnes saines étaient dépourvus de populations microbiennes, stériles. Cependant, avec l'émergence de technologies plus avancées comme le séquençage à haut débit, il est maintenant possible d'effectuer des analyses plus représentatives que celles effectuées avec les techniques traditionnelles utilisant la culture bactérienne. Très peu d'études ont été conduites à ce jour sur l'analyse du microbiome du poumon sain, néanmoins des groupes de recherche rapportent que les genres bactériens les plus présents sont *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella* (Beck 2012; Erb-Downward 2011; Hilty 2010; Huang 2011). Cela dit, l'étude du microbiome pulmonaire normal nécessite beaucoup d'approfondissement, car les quelques études effectuées se basent principalement sur des groupes d'échantillons de petite taille et ne sont pas effectuées de façon longitudinale (Kuczynski 2012). D'autres contraintes d'ordre clinique compliquent la représentation fidèle du microbiome normal. Premièrement, les résultats d'identification microbienne après échantillonnages semblent varier selon les différentes méthodes de prélèvement possibles. Certaines études ont utilisé des prélèvements effectués simultanément à l'intubation de sujets admis à l'hôpital (Flanagan 2007). D'autres groupes de recherche ont plutôt procédé à des lavages broncho-pulmonaires ou des brossages bronchiques ou du parenchyme du poumon (Charlson 2011). Il a été documenté que la flore détectée pouvait varier selon l'endroit dans le poumon où est effectué le prélèvement (Erb-Downward 2011). D'autres évidences suggèrent plutôt que la composition microbienne du poumon est une représentation directe de la population bactérienne rencontrée dans les voies respiratoires supérieures, mais retrouvée en quantité inférieure de biomasse (Charlson 2011). De plus, la caractérisation d'une population microbienne pulmonaire semble être biaisée, car les résultats phylogénétiques varient en fonction de la technique de biologie moléculaire utilisée. Des études se sont concentrées à la

comparaison de ces dites techniques en utilisant le poumon FK comme principal exemple. Selon la méthode utilisée, que ce soit le séquençage à haut débit, l'utilisation de puces phylogénétiques ou bien le RFLP, les résultats diffèrent grandement (Doud 2009; Doud 2010). En considérant ces facteurs, l'analyse du microbiome du poumon de personnes non atteintes de FK est encore à ses débuts. Il est également à noter que les poumons de personnes saines contiennent une charge microbienne nettement inférieure à celle retrouvée chez les patients FK, ce qui en complique également l'étude (Sze 2012).

Des populations microbiennes associées à la fibrose kystique, les plus documentées sont celles constituées d'espèces pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Burkholderia cepacia* étant donné qu'elles sont grandement associées aux bris tissulaires pulmonaires, participant au progrès de défaillances respiratoires (de Vrankrijker 2010). Cependant, un intérêt grandissant est porté sur le microbiome dans son ensemble ainsi que son impact sur l'état de santé des patients atteints de FK (Beck 2012). Il est à noter que les poumons de patients FK constituent un environnement stable, adéquatement tempéré et riche en composés organiques pour favoriser la prolifération de nombreuses espèces bactériennes (Guss 2011). Comme les voies respiratoires de chaque patient constituent des environnements distincts, il est difficile de cerner de façon précise une flore directement attribuable à la fibrose kystique. Or, il devient évident que l'indice de diversité microbienne détecté dans un poumon a un impact sur la santé du patient (Zemanick 2011). Des études ont été réalisées dans le but d'observer le niveau de diversité microbienne présent selon l'âge des patients FK. Une étude réalisée par Cox *et al.* a démontré qu'une diversité microbienne des voies respiratoires réduite pouvait être liée à des fonctions pulmonaires altérées ainsi qu'aux âges plus avancés des patients FK. De plus, un suivi longitudinal pédiatrique a été effectué chez des patients jusqu'à l'âge de 11 ans. Il a été remarqué que chez ces patients, l'indice de diversité augmente avec l'âge. Cette réalité disparaît

cependant à l'âge adulte, où l'on remarque plutôt une diminution de la diversité avec le temps (Cox 2010). D'autres groupes de recherche ont également pu valider ces observations (Klepac-Ceraj 2010). Également, il a été rapporté que les patients souffrants d'infections chroniques et en phase terminale sont infectés de façon dominante par *P. aeruginosa* alors que les patients qui ne sont pas en phase terminale possèdent une flore respiratoire plus diversifiée et caractérisée par une présence plus équilibrée de *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* ainsi que par différentes espèces de *Candida* et *Aspergillus* (Rudkjobing 2012). Il est également intéressant de noter qu'il a été documenté que la richesse en diversité microbienne respiratoire observée chez les patients FK pouvait également être dépendante de facteurs génétiques. En effet, il a été démontré que le niveau de diversité présent diminuait plus rapidement chez les patients hétérozygotes pour la mutation $\Delta F508$ de la protéine CFTR en comparaison avec des patients homozygotes ou tout simplement exempts de cette mutation (Cox 2010).

On sait depuis longtemps qu'il y a présence de microorganismes anaérobies dans les poumons de patients FK (Jewes 1990). Or, les techniques récentes d'identification microbienne nous permettent désormais de mieux les quantifier et potentiellement connaître leur rôle dans le microbiome associé à la fibrose kystique. Le groupe de Tunney *et al.* (Tunney 2008) a observé, dans un groupe de patients adultes stables, que 64 % des échantillons d'expectorations contenaient de grandes quantités d'individus d'espèces anaérobies variant de 10^4 à 10^7 UFC/ml. Parmi ceux retrouvés, les genres les plus communs étaient *Prevotella*, *Actinomyces*, *Veillonella* ainsi que *Propionibacterium*. Le groupe a également observé la flore anaérobie des patients d'âge infantile. Certains résultats observés confirment la présence de microorganismes anaérobies dans les lavages bronchoalvéolaires, distribués selon une variété similaire d'espèces, mais représentés en plus petits nombres. Les similarités observées dans les flores anaérobies des patients FK ne sont cependant pas une réalité chez les personnes non atteintes. Les espèces anaérobies détectées

chez des personnes adultes saines sont représentées par de faibles quantités d'*Actinomyces* et *Streptococcus* variant de 10^2 à 10^5 UFC/ ml d'expectorations. Seulement une rare présence de *Prevotella* est documentée, tout comme l'absence de *Veillonella* et *Propionibacterium*. Les résultats obtenus par ce groupe suggèrent également qu'une infection chronique à *P. aeruginosa* augmente les chances de présence de bactéries anaérobies. Cependant, davantage d'études seront nécessaires pour tirer des conclusions irréfutables. En effet, d'autres groupes de recherche ont obtenu des résultats sensiblement distincts. Une étude, menée auprès de 45 patients atteints de FK, a démontré que des anaérobies ont été détectés dans 91 % des cas, mais attribuant une incidence de seulement 4 cas uniques pour le genre *Prevotella*. Également, contrairement aux résultats discutés ci-haut, la présence de *P. aeruginosa* ne semble pas indiquer une plus forte prévalence des espèces anaérobies. Ces divergences de résultats peuvent être dues à des facteurs géographiques, entre autres (Worlitzsch 2009).

1.3 Interactions inter-espèces du microbiome FK

En considérant la très grande diversité microbienne présente dans la proportion plus restreinte d'environnements distincts disponibles, de multiples interactions chimiques et physiques spécifiques parmi différentes espèces se sont développées au cours des milliers d'années d'évolution (Peters 2012). En fonction du contexte et de l'environnement accessible, les microorganismes ont évolué afin d'adopter des comportements mutualistes, voire même synergiques, facilitant et optimisant la coexistence avec d'autres espèces dans le partage de surfaces ainsi que l'utilisation de métabolites secondaires, par exemple. D'autres ont plutôt acquis des mécanismes compétitifs et antagonistes dans le processus de co-colonisation (Peleg 2010; Peters 2012). Un intérêt grandissant pour les interactions existantes

entre les principaux pathogènes recensés en FK a permis de caractériser diverses relations inter-espèces.

Bien que considérés individuellement comme des plus redoutables en FK, peu d'interactions étaient soupçonnées entre les deux espèces pathogènes, outre l'incidence occasionnelle d'infection sévère à *B. cenocepacia*, établies subséquemment à une infection chronique à *P. aeruginosa* coïncidant habituellement en une rapide diminution du pronostic du patient (McCloskey 2001; Jones 2004). Or, de récentes recherches ont mené à la modélisation d'une relation synergique entre des isolats cliniques de *Burkholderia cenocepacia* et *Pseudomonas aeruginosa*, dans l'établissement de biofilms importants en biomasse qui pourraient contribuer au déclin accéléré de la qualité respiratoire observée chez les patients (Bragonzi 2012). L'étude des infections polymicrobiennes en FK a permis d'observer d'autres phénomènes où la virulence de *P. aeruginosa* semblerait bénéficier de la présence d'une autre espèce microbienne, pathogène ou non (Pihl 2010; Riedel 2001b; Mowat 2010). La présence du groupe des *Streptococcus milleri* (SMG), qui englobe trois espèces de streptococcie d'importance clinique, a été recensée dans un pourcentage élevé des phases d'exacerbation du patient lors d'infections aiguës à *P. aeruginosa* (Sibley 2008; Sibley 2011). En effet, des traitements thérapeutiques ciblant spécifiquement les SMG, lorsque présents, ont mené à la résorption des symptômes d'exacerbations (Sibley 2009). D'un autre point de vue, O'toole *et al.* a démontré que la plus grande abondance des SMG se retrouve chez les patients stables cliniquement. Ils suggèrent plutôt que des niveaux modestes de *S. parasanguis*, *S. salivarius* ainsi que du groupe des *S. milleri* peuvent accroître la diversité microbienne du poumon FK, ce qui bonifie la santé du patient. Seulement en présence surnuméraire de SMG qu'il pourrait y avoir accroissement de la pathogénicité ainsi que la détérioration clinique (Filkins 2012). Par ailleurs, on a également démontré que le 4-hydroxy-2n-heptylquinolone-N-oxide (HQNO), métabolite secondaire de *P. aeruginosa*, pouvait induire une augmentation de la

formation de biofilm ainsi que promouvoir l'émergence du variant à petites colonies (SCV) de *Staphylococcus aureus* (Mitchell 2010b). Ce phénotype, caractérisé par une croissance ralentie et une virulence atténuée, possède une capacité d'internalisation cellulaire accrue et une forte production de biofilm (Mitchell 2011). Cette description est avantageuse dans le contexte d'infections chroniques, car elle réduit le caractère immunogène de la bactérie et facilite son évasion du système immunitaire (Lyczak 2002). Également, il a souvent été discuté que la structure du biofilm pourrait contribuer, de façon importante, à la persistance des infections respiratoires, documentées chez les patients atteints de FK, car il diminue l'efficacité des traitements antibiotiques utilisés pour contrer les infections (Hassett 2010).

1.4 Traitements thérapeutiques contre les populations microbiennes

Les traitements antibiotiques conférés aux patients, qu'ils soient routiniers ou administrés lors de phase d'exacerbation aiguë, provoquant une déstabilisation de la charge microbienne présente dans la flore respiratoire (Zhao 2012). La diversité bactérienne, néanmoins, recolonise les poumons et le tractus respiratoire selon le temps (Zhao 2012; Cox 2010). En effet, dans les cas de maladies ou d'infections chroniques comme celles rencontrées en FK, les traitements administrés semblent induire une forte pression de sélection sur la composition du microbiome (Goerke 2010). Cette pression induite demeure la principale source de modulation des populations microbiennes retrouvées dans les voies respiratoires des patients, et ce, en considérant la variation substantielle et interpersonnelle entre chaque individu (Lynch 2013). Avec de plus en plus d'évidences que les interactions inter-espèces sont de grande instance dans les infections pulmonaires associées à la FK, il semble devenir important de considérer une population polymicrobienne comme une seule entité pathogénique dans l'administration de traitements thérapeutiques (Delhaes 2012). Des études, dirigées sur la stabilité des communautés microbiennes

pulmonaires dans le temps, ont pu démontrer que la richesse de diversité microbienne diminue avec l'âge du patient de façon générale, mais est également associée à des fonctions respiratoires supérieures (Cox 2010; van der Gast 2011; Klepac-Ceraj 2010). Durant les suivis thérapeutiques conférés en phase d'exacerbations chez les patients, il a été observé qu'il y avait peu de changements quant aux communautés bactériennes retrouvées dans les échantillons d'expectorations durant et suivant les traitements antibiotiques (Tunney 2011). Cependant, il est important de noter que les traitements sont souvent dirigés spécifiquement contre *P. aeruginosa*, procurant très peu voire aucune altération de la charge microbienne constituée d'espèces distinctes (Tunney 2011). Il a également été confirmé qu'un traitement donné en prophylaxie afin de prévenir une infection initiale à *P. aeruginosa* ne devrait pas être recommandé, car ceci n'a aucun effet sur l'incidence d'acquisition subséquente du pathogène par l'hôte et par le fait même, augmente les chances de sélectionner d'autres pathogènes (Doring 2012). L'espérance de survie des patients atteints de fibrose kystique a été considérablement augmentée au cours des dernières décennies grâce à différentes mesures. Parmi celles-ci, le diagnostic précoce de la maladie, les suivis de santé effectués par des équipes multidisciplinaires spécialisées, une attention particulière à l'alimentation ainsi qu'un usage stratégique des antibiotiques afin de contrôler les infections chroniques, couplées à une utilisation plus accrue d'antibiotiques intraveineux durant les phases d'exacerbation. (Reid 2011; Dodge 2007) Une récente étude recensant la charge viable de *P. aeruginosa* durant les phases d'exacerbation chez des patients d'âge adulte a permis de solidifier l'hypothèse que ces périodes de défaillances respiratoires ne sont pas attribuables à une augmentation de la présence de *P. aeruginosa* mais bien à une diminution de la diversité microbienne présente (Reid 2013).

La grande attention portée aux soins prodigués ainsi que l'accroissement des connaissances quant à l'évolution de la maladie chez les patients a mené à une

vision différente des infections chroniques associées à la fibrose kystique. On connaît depuis longtemps quels sont les pathogènes les plus redoutables en fibrose kystique en ce qui concerne la virulence, persistance ainsi que la dissimulation de ceux-ci. Les plus prévalents étant *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, pour leur important éventail de facteurs de virulence, grande capacité à acquérir de résistances aux antibiotiques et d'adaptation à leur environnement. Ces aspects ont fait de ces pathogènes les plus préoccupants dans le contexte respiratoire en fibrose kystique, étant donné leur facilité à s'évader du système immunitaire de l'hôte. Or, le développement de techniques plus accrues dans la détection d'espèces microbiennes présentes dans le mucus pulmonaire a mené à la découverte de possibles rôles attribuables à des espèces qui, jusqu'ici, ne présentaient pas d'inquiétudes en lien avec les infections respiratoires chroniques. L'intérêt émergent et grandissant pour l'étude des microbiomes entraîne une nouvelle école de pensée portant les communautés bactériennes diverses, plutôt que les espèces seules, à être reconnues comme agent infectieux potentiel. Cette réalité s'applique fortement dans la progression de maladies pulmonaires chroniques comme la fibrose kystique, dont la production altérée du mucus respiratoire potentialise la colonisation et l'établissement d'une très grande diversité microbienne. Il devient donc de première instance de considérer la richesse des populations polymicrobiennes dans le monitoring et le traitement des défaillances respiratoires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique.

1.5 Biofilm polymicrobien dans les infections chroniques

Avant même qu'on parle de biofilm, les premiers constats médicaux ont documenté des agrégats ou masses de bactéries, initialement attribués aux infections chroniques à *P. aeruginosa*, dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique (Bjarnsholt 2013; Holby 1977b; Holby 1977a). Aujourd'hui, presque quatre

décennies plus tard, les connaissances sur le biofilm, sa structure et son implication dans divers contextes, biotiques ou abiotiques, ont grandement augmenté. Le biofilm, qu'on pourrait parfois caractériser de matrice d'ancrage et/ou de dôme protecteur, est une construction hétérogène constituée notamment de débris cellulaires, d'ADN extracellulaire ainsi que d'exopolysaccharides (Seidl 2008; Begun 2007; Cataldi 2013). On a également révélé la présence de biofilm dit protéo-dépendant, établi principalement par l'utilisation de protéines extracellulaires (Mitchell 2013; Gil 2013). Le biofilm procure aux populations bactériennes une facilité de colonisation de leur environnement, une barrière contre les mécanismes de défense de l'hôte ainsi qu'une protection des molécules antibiotiques ou désinfectantes (Begun 2007; Hassett 2010). Toutes ces caractéristiques sont de grande importance dans les infections chroniques respiratoires associées à la fibrose kystique (Bjarnsholt 2010; Bjarnsholt 2013; Deligianni 2010; Kobayashi 2009; Mitchell 2010b; Tuchscher 2011; Cataldi 2013; Lyczak 2002; Proctor 2006). Si bien que le biofilm, facteur colonisateur connu, joue également le rôle de facteur de virulence en agissant à titre de procédé pathogénique (Mitchell 2010b; Cataldi 2013). En fibrose kystique, l'effet délétère perçu sur les capacités respiratoires des patients, qui leur sera ultimement fatal dans la majorité des cas, survient de façon progressive suite à la succession d'incidences d'infections aiguës et d'inflammation soutenue (Cataldi 2013; Deschaght 2013). Donnant lieu à des bris tissulaires, de l'inflammation ainsi qu'un effet négatif sur l'efficacité structurale des poumons, ces épisodes d'exacerbation pulmonaire sont en fonction d'une persistance accrue des agents pathogènes (Deschaght 2013; Ulrich 2010; Brennan 2008; Heijerman 2005). Le biofilm participe grandement à donner le caractère chronique aux infections bactériennes puisqu'il contribue à la dissimulation ainsi qu'à la dissémination des populations infectieuses, nuisant à leur éradication par le système immunitaire de l'hôte (Gil 2013; Ciofu 2012). De nombreuses études récentes font état de l'importance de s'intéresser aux populations polymicrobiennes ainsi qu'à leurs interactions avec l'hôte et entre elles dans l'environnement pulmonaire associé à la fibrose kystique (Sibley 2011; Zemanick 2011; Sibley 2009; Lynch 2013; Twomey 2013).

1.6 Adaptation des populations polymicrobiennes au poumon de l'hôte

Un nombre limité d'espèces microbiennes ont été identifiées comme d'importants pathogènes en FK parmi lesquels on retrouve *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cenocepacia* et *Haemophilus influenzae* (Hoffman 2013; Twomey 2013; Lyczak 2002). Le rôle spécifique de la composition du microbiome FK et son impact sur l'émergence de sous-populations chez les différentes espèces sont encore mal connus (Lynch 2013). Cependant, plusieurs observations suggèrent que la co-existence entre les différentes espèces microbiennes, dans l'environnement instable du poumon FK, favorise l'apparition de nouveaux clones métaboliquement adaptés (Besier 2007; Bjarnsholt 2010; Goerke 2010; Tuchscher 2011; Hauser 2011). Ce type de modifications génétiques semble procurer des avantages de sélection aux microorganismes comme *P. aeruginosa*, durant les infections chroniques en FK (Smith 2006). Ceci pourrait expliquer en partie l'émergence de souches dites épidémiques en FK (Scott 2004).

Chez *P. aeruginosa*, *S. aureus*, de même que chez *H. influenzae*, le caractère hypermutable de certaines souches permet une grande plasticité du génome bactérien (Besier 2008; Ciofu 2005; Hogardt 2007; Oliver 2000; Prunier 2003; Roman 2004). De plus, une baisse de production de molécules antioxydantes durant la croissance en biofilm dans les conditions anoxiques des cavités inférieures pulmonaires contribue à augmenter le nombre de nouvelles mutations (Boles 2004; Driffield 2008). De ce fait, l'acquisition de mutations ponctuelles se fait plus aisément en réponse à l'environnement du mucus pulmonaire et il en résulte l'obtention d'un éventail de populations clonales génétiquement rapprochées mais présentant certaines modifications uniques au niveau de certains gènes (Smith 2006).

L'environnement pulmonaire procure ensuite les conditions favorisant la croissance des clones dont les adaptations phénotypiques procurent un avantage de sélection (Hogardt 2007; Nguyen 2006; Smith 2006). Des analyses temporelles d'échantillons provenant d'un même patient ont démontré que des changements majeurs étaient observables pour un même haplotype de *P. aeruginosa* (Mowat 2011).

Bon nombre d'études récentes ont documenté les changements, dans les mécanismes de régulation de *P. aeruginosa*, subséquents à l'adaptation de la population bactérienne à l'environnement pulmonaire des patients atteints de FK (Mowat 2011; Goerke 2010; Ciofu 2012). Hunter *et al* ont réussi à négativement corréler la présence de phenazines produites par *P. aeruginosa* avec la santé respiratoire des patients (FEV1) et le niveau de diversité microbienne retrouvé (Hunter 2012). Largement étudié et principalement associé aux phases d'exacerbation pulmonaire, *P. aeruginosa* possède un système complexe de «Quorum-Sensing» (QS) composé de trois paliers de régulation différents (Mitchell 2012). Par le biais d'une batterie de molécules chimiques issues du QS, *P. aeruginosa* régule sa virulence au sein de sa population, en fonction de sa densité (Dubern 2008). D'une autre part, il a été démontré que certaines molécules produites par *P. aeruginosa* étaient utiles dans la communication inter-espèces, notamment dans le biofilm polymicrobien associé aux infections respiratoires chroniques en FK (Reen 2011). Il a été démontré que *Burkholderia cepacia* pouvait reconnaître les molécules de *N*-acyl homosérines lactones produites par *P. aeruginosa* pour réguler sa propre virulence et qu'en situation de co-infection, il y a stimulation de la formation de biofilm ainsi qu'une plus importante réponse inflammatoire chez l'hôte (Bragonzi 2012; Riedel 2001a; Biswas 2009; Hoffman 2006). Un autre exemple marquant d'adaptation issue du contexte pulmonaire FK est l'émergence du phénotype SCV chez *S. aureus* qui a été associée une forte production de biofilm, une atténuation d'expression de facteurs de virulence ainsi qu'une capacité accrue d'internalisation des cellules épithéliales (Mitchell 2010a; Mitchell 2011; Proctor 2006). Fonctionnant

également par l'entremise de communication cellulaire (QS), des altérations au système *agr* et surtout au niveau de l'expression du facteur alternatif SigB expliquerait l'apparition de ce phénotype spécialisé aux infections chroniques. SigB est donc un régulateur dominant de la virulence chez les SCV (Mitchell 2013; Mitchell 2010a; Moisan 2006). L'apparition de ce phénotype a également été observée suite à l'exposition de composés produits par *P. aeruginosa* (Mitchell 2010b).

1.7 Modulation et évation du système immunitaire de l'hôte

L'évacuation mucociliaire non inflammatoire des pathogènes étant déficiente chez les patients atteints de FK, le recrutement des mécanismes de défense inflammatoire est impérativement mené par le système immunitaire de l'hôte (Gibson 2003; Knowles 2002; Bjarnsholt 2013; Ulrich 2010). De plus, les cellules immunitaires présentent des fonctions altérées chez les patients atteints de FK, diminuant leur capacité à phagocyter les particules présentes dans les voies respiratoires, incluant les pathogènes (Alexis 2006). Associé à la colonisation pulmonaire, le biofilm n'est pas seulement structurellement résistant, il joue également un rôle important dans l'évasion du système immunitaire par les bactéries. Thomas Bjarnsholt et son équipe, notamment par l'observation intraluminale de biofilm formé par *P. aeruginosa* dans des poumons explants de patients, suggèrent que le biofilm microbien est retrouvé sous forme d'agrégats dans le mucus pulmonaire plutôt qu'établi directement sur les cellules épithéliales comme il était initialement proposé (Bjarnsholt 2009; Bjarnsholt 2013; Worlitzsch 2002). Premièrement, le biofilm réduit l'accès des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) et macrophages aux bactéries viables, altérant fortement la capacité de phagocytose. En combinaison avec la formation de biofilm et comme détaillé précédemment, les pathogènes du microbiome FK s'adaptent et développent des stratégies pour utiliser le système immunitaire altéré de l'hôte à leur avantage (Callaghan 2012). Dans les infections chroniques, *P. aeruginosa* est

souvent retrouvé présentant des phénotypes atténués dans la sécrétion de facteurs de virulence invasifs, pour optimiser la synthèse d'alginate et acquérir un phénotype mucoïde (Heurlier 2005; Hoffman 2009; Callaghan 2012; Damron 2011). On associe ce phénotype à une forte production de biofilm et rend la phagocytose impossible par les PMN (Callaghan 2012). *S. aureus* est attribué, notamment, au phénotype SCV qui lui permet de mieux internaliser les cellules infectées et procéder à une éviction efficace du système immunitaire de l'hôte. (Tuchscher 2011; Mitchell 2010a; Mitchell 2011) Jusqu'à maintenant, on connaît très peu sur le comportement des populations polymicrobiennes quant à leur modulation possible du système de défense du patient atteint de fibrose kystique.

1.8 Contexte, hypothèse et objectifs de recherche

Les patients atteints de fibrose kystique (FK), dans la majorité, décéderont de défaillances respiratoires causées par des infections bactériennes chroniques pouvant être causées par des pathogènes opportunistes comme *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* est retrouvé chez 45,7% des patients, alors que *P. aeruginosa* est retrouvé dans 42,4% des cas, faisant des deux espèces les plus souvent détectées en FK (CysticFibrosisCanada 2011). Ces deux espèces pathogènes se retrouvent donc souvent ensemble chez les patients adultes. Il est maintenant évident que les deux espèces, retrouvées dans les voies respiratoires des patients atteints de FK, sont capables d'interagir ensemble dans différents processus d'importance dans la pathophysiologie comme la formation du biofilm qu'on associe aux infections chroniques (Mitchell 2010b; Yang 2011; Mashburn 2005; Qazi 2006). Nous avons déjà démontré que le 4-hydroxy-2-heptylquinolone *N*-oxide (HQNO), un exoproduit de *P. aeruginosa*, induit l'émergence de *S. aureus* SCVs. De plus, le HQNO favorise la formation de biofilm par *S. aureus*. Ceci s'explique par la

génération de SCVs et par l'induction du facteur alternatif SigB chez *S. aureus* (Mitchell 2010b).

Notre hypothèse suggère que *S. aureus* et *P. aeruginosa* peuvent s'adapter pour coexister chez les patients atteints de FK en acquérant des mutations ou en modulant l'expression de certains gènes suite à l'échange de molécules sécrétées. Nous supposons donc la possibilité que *S. aureus* produise des composés pouvant exercer un effet sur le comportement de *P. aeruginosa* et vice-versa dans l'établissement d'infections respiratoires chroniques chez les patients atteints de FK. Ce projet utilise une banque de co-isolats cliniques de *P. aeruginosa* et *S. aureus* récoltés chez les patients FK afin d'étudier les interactions et les adaptations des deux espèces bactériennes. Un intérêt est également porté au niveau de l'impact de la coexistence des deux pathogènes sur la santé respiratoire des adultes atteints de FK.

L'objectif principal du projet est d'évaluer l'impact des interactions moléculaires présentes entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur la pathophysiologie associée aux infections respiratoires dont sont victimes les patients atteints de FK. Spécifiquement, les effets réciproques des exoproduits ont été caractérisés par leurs effets sur le biofilm et la virulence de l'espèce représentée en contrepartie. Le développement d'un modèle *In vitro* a permis de mettre en évidence, certains effets d'une coadaptation des espèces bactériennes entre elles. Finalement, des données récoltées relatives à la santé des patients ont été utilisées pour proposer des incidences des populations mixtes sur la condition respiratoire dans un contexte associé à la fibrose kystique.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

2.1 Introduction de l'article I

Titre: Interspecific Small Molecule Interactions Between Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* From Adult Cystic Fibrosis Patients

Journal: PLOS ONE, accepté le 12 décembre 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0086705

L'article ci-présent documente les résultats d'une étude dont le sujet s'insère dans un intérêt d'actualité en ce qui concerne les infections respiratoires chroniques en FK. Ce travail définit des interactions possibles et existantes entre deux pathogènes de haute instance dans la pathophysiologie associée à la FK. Les interactions polymicrobiennes dans l'environnement pulmonaire des patients intéressent beaucoup de chercheurs et leur description pourrait avoir d'importants impacts sur les cibles thérapeutiques et sur les traitements cliniques chez les patients. Le travail de cette recherche combine les travaux d'Alexandre Fugère et David Lalonde Séguin quant aux expérimentations en laboratoire, l'analyse des résultats ainsi que l'écriture de la publication. Gabriel Mitchell a grandement participé aux designs expérimentaux et à l'analyse des résultats. Éric Déziel et Valérie Dekimpe ont conduit les expériences d'analyses instrumentales en LC/MS. Pr André M Cantin a fourni tout le support nécessaire en ce qui concerne la collection de

données cliniques et leur signifiante tandis que Eric Frost a fourni un expertise en microbiologie clinique. Les travaux ont été dirigés par François Malouin.

2.2 TITLE PAGE

Interspecific Small Molecule Interactions Between Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* From Adult Cystic Fibrosis Patients

Alexandre Fugère^{1,§}, David Lalonde Séguin^{1,§}, Gabriel Mitchell¹, Eric Déziel², Valérie Dekimpe², André M. Cantin³, Eric Frost⁴, François Malouin^{1,#}

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM),
Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1.

²INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada, H7V 1B7.

³Département de pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4.

⁴Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des
sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1E 4K8

[§]Contributed equally to the work.

[#]Corresponding author: Mailing address: Université de Sherbrooke, Département de
biologie, Faculté des sciences, 2500 boul. Université, Sherbrooke, QC, Canada,

J1K2R1. Phone: 819-821-8000 ext. 61202. Fax: 819-821-8049. E-mail:

Francois.Malouin@USherbrooke.ca

2.3 ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus* are the most prevalent pathogens in airway infections of cystic fibrosis (CF) patients. We studied how these pathogens coexist and interact with each other. Clinical isolates of both species were retrieved from adult CF patients. Culture supernatants from 63 *P. aeruginosa* isolates triggered a wide range of biofilm-stimulatory activities when added to the culture of a control *S. aureus* strain. The extent of biofilm formation by *S. aureus* was positively correlated to the levels of the 2-alkyl-4-(1H)-quinolones (AQs) *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) and 2-heptyl-4-hydroxy quinoline *N*-oxide (HQNO) produced by the *P. aeruginosa* isolates. Supernatants from *P. aeruginosa* isogenic mutants deficient in PQS and HQNO production stimulated significantly less biofilm formation by *S. aureus* than that seen with the parental strain PA14. When studying co-isolated pairs of *P. aeruginosa* and *S. aureus* retrieved from patients showing both pathogens, *P. aeruginosa* supernatants stimulated less biofilm production by the *S. aureus* counterparts compared to that observed using the control *S. aureus* strain. Accordingly, some *P. aeruginosa* isolates produced low levels of exoproducts and also some of the clinical *S. aureus* isolates were not stimulated by their co-isolates or by PA14 despite adequate production of HQNO. This suggests that colonization of the CF lungs promotes some type of strain selection, or that co-existence requires specific adaptations by either or both pathogens. Results provide insights on bacterial interactions in CF.

2.4 INTRODUCTION

Cystic fibrosis is a common life-shortening autosomal recessive disorder that manifests as clinical syndromes of chronic pulmonary infections, gastrointestinal disorder, nutritional and other abnormalities. However, the majority of individuals with CF ultimately succumb to respiratory failure primarily caused by chronic airway bacterial infections from mixed microbial communities [1]. In many cases, *Staphylococcus aureus* is predominant in infections occurring during childhood but colonization by *Pseudomonas aeruginosa* gradually increases as CF patients grow older. Nevertheless, *S. aureus* persists and is one of the most prevalent pathogens in adult CF patients along with *P. aeruginosa* [2,3,4]. Despite such documented and frequent co-colonization of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, very little is known about the impact of polymicrobial infections on patient health. Also, it is now becoming obvious that bacteria found in CF airways interact together in several different ways [5,6,7,8,9,10,11,12]. It has been proposed that *S. aureus* could prepare the respiratory tract epithelia of CF patients to promote the subsequent colonization of *P. aeruginosa* [13]. Studies are needed to understand how these microbial interactions develop, affect the balance of colonization and the progression of disease [14].

P. aeruginosa produces many extracellular molecules during its different growth phases. Synthesis of many of these compounds is controlled by quorum sensing (QS) regulatory systems. Their impact on other bacterial populations has also become an important research topic. Among QS-controlled pseudomonal factors, LasA, pyocyanin, hydrogen cyanide, and alkyl quinoline *N*-oxides have been reported to reduce *S. aureus* growth [15,16,17]. Prolonged growth of *S. aureus* with physiological concentrations of the *P. aeruginosa* exoproduct 4-hydroxy-2-heptylquinoline-*N*-oxide (HQNO) induces a sub-population of slow-growing, respiratory deficient *S. aureus* named small-colony variants (SCVs) [16]. We have also shown that *S. aureus* biofilm production is increased in presence of *P. aeruginosa* supernatant or HQNO, and that

the staphylococcal stress- and colonization-related alternative sigma factor B (SigB) is involved in this response [18]. Another class of pseudomonal QS-regulated molecules, the *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), was also reported to affect *S. aureus* populations. At sub-inhibitory concentrations, long chain AHLs like *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone reduce exotoxins production and down-regulate both *agr* and *sarA* expression in *S. aureus* [7]. To add to the complexity of these bacterial interactions, previous studies have demonstrated that the formation of biofilm by *S. aureus* can be influenced by *agr* [19], *sigB* [20] and *sarA* [21], while *P. aeruginosa* also produces the QS-regulated biosurfactant rhamnolipids, which can disrupt biofilms and show some inhibitory activity on Gram positive bacteria, such as *S. aureus*. [22,23,24].

Biofilms may play a major role in the development of chronic lung infections in CF. They confer to bacteria protection from host defenses as well as tolerance to some antibiotics that target active and dividing cells [13,25]. In addition, biofilms also provide protection against hydrodynamic shear forces, and biofilm infections are generally difficult to eradicate even in hosts with intact immune system [26,27]. In fact, it was estimated that biofilm formation is involved in 65% of nosocomial infections in the United States [28] and most chronic infections [29] [30]. Naturally-occurring biofilms represent complex and integrated polymicrobial communities in which cell-to-cell signals may alter bacterial growth and virulence [31,32].

Considering the genetic diversity and hypermutability of *P. aeruginosa* isolates from CF lungs [33,34,35], the susceptibility of *S. aureus* to various *Pseudomonas* exoproducts and the complex regulatory mechanisms involved in *S. aureus* biofilm production, a variety of patient-specific interactions between *P. aeruginosa* and *S. aureus* is likely to exist. The aim of this study was to investigate the types and consequences of the interactions between *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-isolated from adult CF patients. Measurements of some relevant exoproducts were done to demonstrate the complexity and heterogeneity of *P. aeruginosa* isolates and to

determine the impact of such molecules on *S. aureus* biofilm formation, a relevant virulence determinant.

2.5 MATERIALS AND METHODS

2.5.1 Ethics statement

This study was approved by the ethics review board of the CHUS (Comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke) under Protocol 06-158-R6. Informed written consent was obtained from all subjects (all adults over 18 years of age) prior to recruitment to the study; a document explaining the study objectives and procedures was read to the subject and two copies were signed, one for the subject and the other for our files and for review by the ethic committee. This consent procedure was also reviewed and approved by the ethic committee prior to the study. An annual review and re-approval process was also requested by the ethic committee. Approval was obtained for each of the three years of the study.

2.5.2 Bacterial strains, media and growth conditions.

P. aeruginosa PA14 was the prototypical reference strain used in the present study [36]. The *P. aeruginosa* PA14-derived mutants *pqsA*, *pqsE*, *pqsH* and *pqsL* were all previously described [37,38,39], as were the *lasR/rhlR* double-mutant and the *rhIA* mutant [40,41]. The relevant properties of these mutants are listed in Table 1. *S. aureus* CF1A-L is a strain isolated from a CF patient and its characteristics in relation to biofilm production and response to some *P. aeruginosa* PA14 exoproducts have

already been described [18]. *S. aureus* CF1A-L was thus used as a control strain in this study. For routine maintenance, *P. aeruginosa* was grown on TSA (BD, Mississauga, ON, Canada) and subcultured in TSB (BD), whereas *S. aureus* was grown on BHI agar and broth (BD, Mississauga, ON, Canada).

2.5.3 Clinical isolates

Clinical isolates of *P. aeruginosa* and *S. aureus* were obtained from 32 adult CF patients at the CF outpatient clinic of the *Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke* (CHUS, Quebec, Canada). The age of patients ranged from 18 to 41 year old (mean of 25). Through routine visits or during hospitalization (exacerbation), sputum samples were obtained by expectoration or by deep throat swab if no bronchial secretions were produced by the patient. Up to 6 samples were obtained for some patients over a period of 3 years. For all specimens, detection of *S. aureus* and *P. aeruginosa* was made by routine methods. Specimens were streaked on sheep blood agar, MacConkey and mannitol salt agar (MSA) and incubated at 35°C for a minimum of 48 hours. Suspected *P. aeruginosa* colonies growing on MacConkey were confirmed by the oxidase test and their capability to grow at 42°C, and by the Vitek II XL AutoMicrobic System Gram-negative identification card (bioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo.). To facilitate detection and confirm the identification of *S. aureus*, a portion of each specimen was also treated as follows. For sputum samples, 100 µl of DTT (100 mg/ml) were added to 100 mg of sputum [42]. From this solution, 100 µl were then added to 10 ml of NaCl broth that consisted of 7.5 g tryptone, 1.25 g neutralized liver digest, 2.5 g yeast extract, 37.5 g NaCl, 5 g D-mannitol, and 2 g of glucose in a final volume of 500 ml. For deep throat specimens, swabs were directly used to inoculate 10 ml of NaCl broth. Cultures were aerobically incubated at 35°C with shaking (225 rpm) for 48 h. Aliquots were then plated on MSA for detection and

isolation of *S. aureus*. Suspected *S. aureus* colonies were confirmed with the Pasteurex Staph Plus test (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France), detection of catalase and by PCR detection of the *femA* gene [43] and of the 668 pb product amplified from the *nuc* gene by using the following primer sequences: *nuc* FWD 5'-GGCATCTAGAGCTAAGTCGTGGCATATGTATGGC-3' and *nuc* REV 5'-CCGCACTAGTCCTTGACCTGAATCAGCGTTG-3'. The *mecA* gene coding for the low-affinity penicillin-binding protein responsible for methicillin resistance in *S. aureus* [44] was also tested by PCR. All isolates were kept at -86°C until used.

A total of 63 clinical *P. aeruginosa* isolates were selected for further studies and these included 23 that were co-isolated with a *S. aureus* strain. This collection was completed with 21 *S. aureus* strains that were not co-isolated with *P. aeruginosa*. The selected bacterial strains were from different patients or from a sample of the same patient collected at a different visit, which occurred 3-8 months apart. A few strains were from the same sample. The *P. aeruginosa* strains collected from the same patient were screened for mucoidy and pigmentation characteristics and only those with obvious phenotypic differences were considered in the study. *S. aureus* strains collected from the same patient were selected based on their distinctive antibiotic resistance profile or VNTR type (multiple-locus variable-number of tandem repeats, [45]).

2.5.4 Collection of clinical data

Clinical data were associated with each specimen and included age, sex, medical condition and FEV1 (forced expired volume in 1 second) at the time of the visit. The FEV1 was evaluated by the CF clinic's respirologist and recorded with a

Jaeger MasterScope spirometer (VIASYS Healthcare GmbH, Hochberg, Germany). The FEV1 was expressed as a percentage of the predicted value (100%) which depends on the sex, age and body height of each patient. This study was approved by the ethics review board of the CHUS. Informed consent was obtained from all subjects prior to recruitment to the study.

2.5.5 *P. aeruginosa* culture supernatant preparation

Overnight primary cultures of *P. aeruginosa* were used to inoculate 50 ml of TSB in 125-ml flasks at a dilution of 1:100. Cultures were grown aerobically under agitation (225 rpm) for 20 h at 35°C. Supernatants were retrieved by centrifugation at $2,300 \times g$ and filter-sterilized using 0.22 μm pore size (VWR, Mont-Royal, Canada) and used immediately. A culture supernatant from *Escherichia coli* K12 grown in TSB was used as a control.

2.5.6 Pyocyanin extraction and quantification

Four ml of chloroform was added to 5 ml of *P. aeruginosa* culture supernatants prepared as described above. After vigorous vortexing, solutions were let to rest until two distinct phases were apparent. The organic phase contains the pyocyanin and is usually colored (blue-green). The top aqueous phase was discarded without disrupting the organic phase. Pyocyanin was then extracted by adding 1 ml HCl 0.2M combined to another cycle of vortex and resting of the mixture. The pyocyanin-containing phase then appeared in shades of pink and was retrieved. Aliquots of 200 μl were serially diluted in 96-well plates with sterile phosphate-buffered saline (PBS,

Sigma) and absorbance was read at 520 nm, using an Epoch plate reader (BioTek Instruments, Winooski, USA).

2.5.7 2-alkyl-4-(1*H*)-quinolones (AQs) and *N*-acyl-homoserines lactones (AHL) extractions

Sixteen μ l of an internal standard containing 8 ppm of 5,6,7,8-tetradeutero-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (PQS-d4), and 4 ppm of 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) were added directly to 2 ml of culture supernatant. After mixing by inversion, a quick spin was done to breakup emulsions and extraction was performed twice with 2 ml of ethyl acetate. The organic phases were combined, evaporated and the residue suspended with 500 μ l acetonitrile directly in HPLC vials. Samples were stored at -20°C until analyzed.

2.5.8 LC/MS analyses

Analyses were achieved with a Micromass Quattro II triple quadrupole mass spectrometer (Micromass Canada, Pointe-Claire, Canada) in positive electrospray ionization mode, interfaced to an HP1100 HPLC equipped with a 4.5 x 150 mm reverse-phase C₈ column, as reported [46,47].

2.5.9 Biofilm formation

To evaluate the effect of *P. aeruginosa* supernatants on biofilm formation by *S. aureus* CF1A-L (control) or other clinical isolates, the supernatants were filter sterilized and diluted in TSB at concentrations ranging between 0 and 25% (v/v). The diluted supernatants (100 µl) were distributed in a 96-well tissue culture treated flat-bottom polystyrene microtiter plate (BD). A *S. aureus* suspension (0.5 McFarland standard) was then prepared in BHI-0.5% glucose and 100 µl were added to each well of the plate already containing the *P. aeruginosa* supernatant dilutions. The plates were incubated for 48 h at 35°C. The cultures were then discarded and the wells were carefully washed three times with 200 µl PBS. Once dried, the plates were treated for 30 min with 200 µl of a 0.1% (p/v) crystal violet solution (sigma HT90132) to stain the biofilm, rinsed twice with 200 µl water to remove excess dye, and then allowed to dry. Finally, the wells were filled with 200 µl 95% ethanol and incubated at room temperature for 1 h with intermittent agitation. The absorbance of each well at 560 nm was then measured. The assays were repeated three times and included three replicates for each condition tested. For each supernatant concentration tested, dose-dependent results were presented relatively to the normal biofilm production level of *S. aureus* measured in the absence of *P. aeruginosa* supernatant. Also, net biofilm increases were calculated by summation of the differences between biofilm formation quantified at each supernatant concentration and the normal biofilm formation level for each strain.

2.5.10 Statistics

Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism Software (v.5.00). Tests used for the analysis of each experiment are specified in the figure legends.

Table 1: *P. aeruginosa* reference and mutant strains

Strain	Relevant characteristics	Consequence or principal compound for which biosynthesis is altered	Reference
<i>P. aeruginosa</i>			
PA14	Clinical isolate UCBPP-PA14, Rif ^R	None	[36]
PA14 Δ <i>lasR/rhlR</i>	PA14 <i>lasR/rhlR</i> ; Gm, Tc	Altered in QS circuitry and all AQs production	[40]
PA14 Δ <i>pqsA</i>	PA14 <i>pqsA</i> ::TnphoA; Rif ^R , Km ^R	HHQ; PQS*, HQNO*	[37]
PA14 Δ <i>pqsE</i>	PA14 <i>pqsE</i> ; Amp ^R	Altered in QS circuitry and required for pyocyanin production	[37]
PA14 Δ <i>pqsL</i>	PA14 Δ <i>pqsL</i> ; Rif ^R	HQNO	[38]
PA14 Δ <i>pqsH</i>	PA14 <i>pqsH</i> :: <i>aacC1</i> cassette; Gm ^R , Km ^R	PQS	[39]
PA14 Δ <i>rhIA</i>	PA14 <i>rhIA</i> ::TnMrT7;	Rhamnolipids	[41]

*Altered biosynthesis of the precursor molecule.

2.6 RESULTS

2.6.1 Clinical isolates of *P. aeruginosa* trigger a wide range of biofilm formation responses in *S. aureus*

To measure the effect of *P. aeruginosa* culture supernatants on *S. aureus* biofilm formation, the previously described clinical *S. aureus* strain CF1A-L [18], was used as a reference. This *S. aureus* strain was considered an adequate candidate to act as a control since it shows an increased biofilm production in response to *P. aeruginosa* PA14 supernatant and because it was originally retrieved from a CF patient who was not co-colonized with *P. aeruginosa* [18]. The supernatant from *P. aeruginosa* strain PA14 was used as a positive control for typical production of QS-related compounds

[36,37]. As a matter of fact, the supernatant from a culture of *P. aeruginosa* PA14 stimulates *S. aureus* CF1A-L biofilm formation in a dose-dependent manner with an overall ~2.5-fold increase in biofilm production compared to that observed in the absence of the *P. aeruginosa* supernatant ($P < 0.001$). As expected, biofilm formation was not significantly stimulated in the presence of an *E. coli* K12 supernatant as it does not produce any known stimulatory molecule for *S. aureus* (Fig. S1). Dose-dependent biofilm stimulation was then assayed with supernatants from all 63 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Some isolates demonstrated high stimulating ability such as *P. aeruginosa* PAC26A (Fig. 1A) while others acted as poor biofilm inducers like PAC18A, which exhibited no significant biofilm stimulation activity in comparison to the *E. coli* control supernatant (Fig. 1B). $A_{560\text{nm}}$ values measured for crystal violet-stained biofilms formed in the absence of supernatant (control condition, 0% supernatant) were subtracted from the $A_{560\text{nm}}$ values detected at each concentration of supernatant (0.2 to 12.5% *P. aeruginosa* supernatant) and summed up in order to calculate the net biofilm increase induced by each *P. aeruginosa* isolate supernatants. Results revealed a wide distribution of biofilm stimulation activities by the 63 *P. aeruginosa* clinical isolates, among which 30% (19/63) of isolates showed significant stimulation of CF1A-L biofilm production, as calculated with Sidak's multiple comparisons test (Fig. 1C). *S. aureus* CF1A-L biofilm modulation ranged from slight inhibition (-0.19 $A_{560\text{nm}}$) to strong induction (+2.70 $A_{560\text{nm}}$), depending on the *P. aeruginosa* isolate (Fig. 1C).

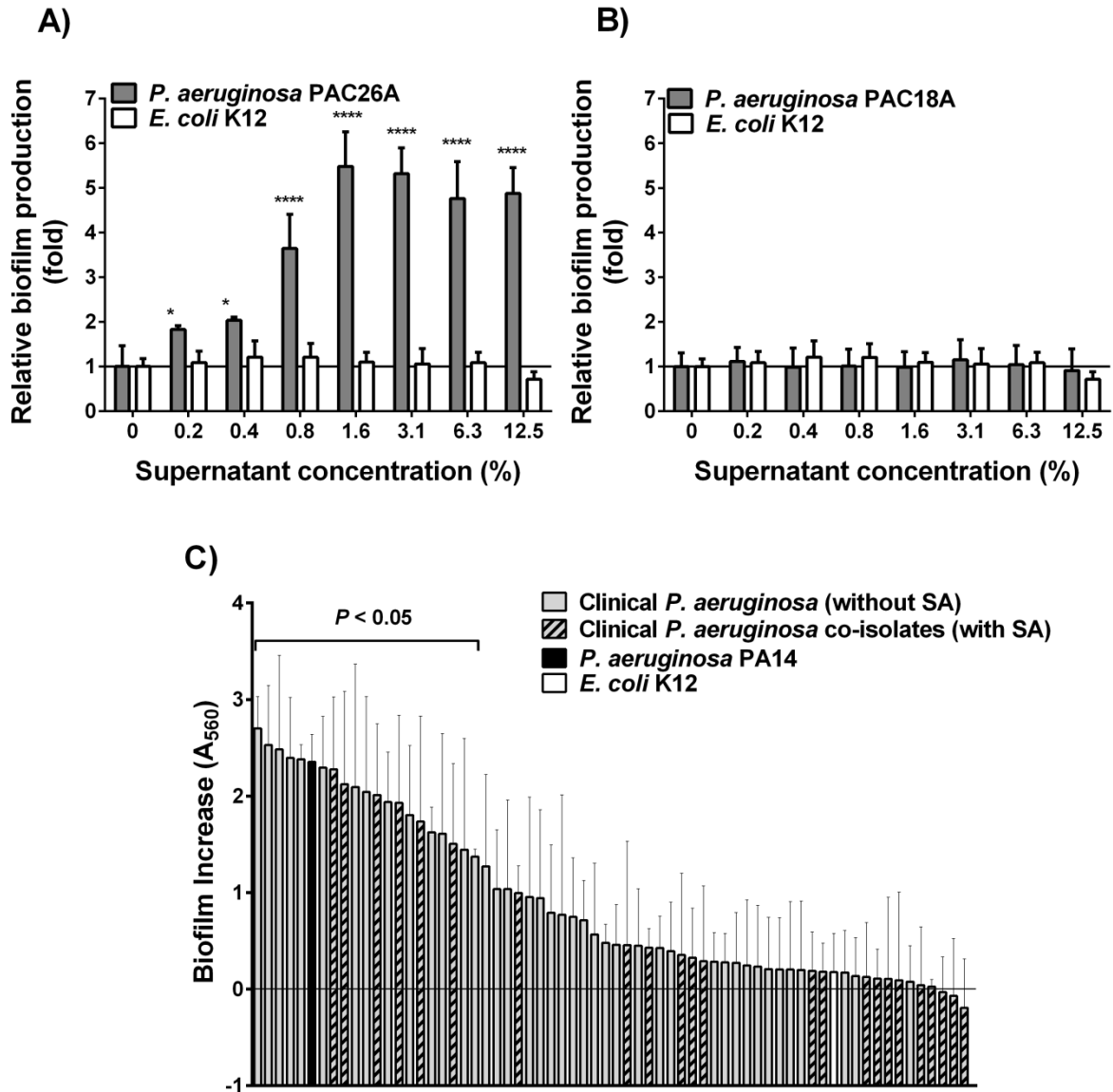


Figure 1. *S. aureus* biofilm stimulation by clinical *P. aeruginosa* supernatants. *S. aureus* CF1A-L biofilm production in response to culture supernatants from clinical isolates of *P. aeruginosa*. (A) Supernatant from the clinical strain *P. aeruginosa* PAC26A stimulates *S. aureus* CF1A-L biofilm formation in a dose-dependent manner, while in (B) a supernatant retrieved from *P. aeruginosa* strain PAC18A does not. Biofilm increase was measured at each supernatant concentration after 48 h of incubation and results were normalized relatively to the

biofilm production measured in the absence of *P. aeruginosa* supernatant. Means and standard deviations for triplicates of each supernatant concentration are shown. Statistical significance was determined by a two-way ANOVA and the Bonferroni's multiple comparison post-test (*, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$). (C) The dose-dependent biofilm stimulation of *S. aureus* CF1A-L was measured after treatment with supernatants obtained from 63 clinical isolates of *P. aeruginosa*. The mean $A_{560\text{nm}}$ value measured for *S. aureus* CF1A-L biofilm formed in the absence of *P. aeruginosa* supernatant (control condition, 0% supernatant) was subtracted from the $A_{560\text{nm}}$ value detected at each concentration of supernatants (0.2 to 12.5% supernatants as in panels A and B) and summed up in order to calculate the net biofilm increase induced by each *P. aeruginosa* isolate (panel C). Supernatants from *P. aeruginosa* PA14 and *E. coli* K12 were used as positive and negative controls, respectively. Significant differences with the control condition were determined by Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

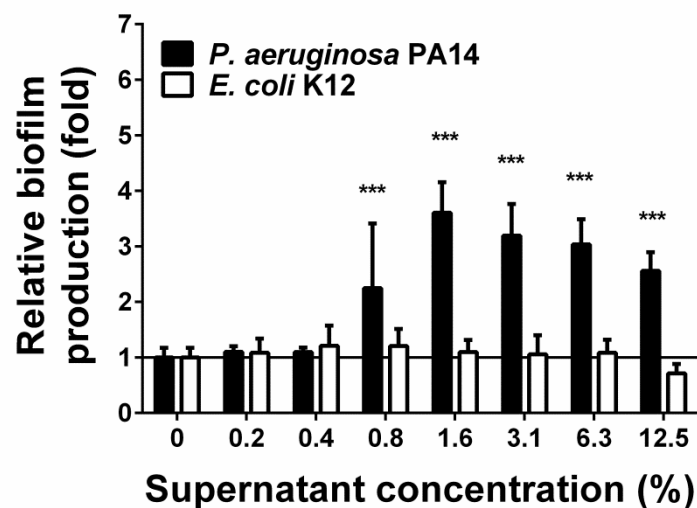


Figure S1. *S. aureus* CF1A-L biofilm production in response to the culture supernatant of *P. aeruginosa* PA14. Biofilm increase was measured at each supernatant concentration after 48 h of incubation and results were normalized

relatively to the biofilm production measured in the absence of *P. aeruginosa* supernatant. Means and standard deviations for triplicates of each supernatant concentration are shown. Statistical significance was determined by a two-way ANOVA and the Bonferroni's multiple comparison post-test (***, $P < 0.001$). A supernatant from *E. coli* K12 was used as negative control.

2.6.2 *S. aureus* biofilm stimulation by *P. aeruginosa* is associated with PQS and HQNO production

LC/MS analysis of *P. aeruginosa* supernatants was performed for each clinical isolates in order to determine the concentration of 2-heptyl-4-hydroxyquinoline (HHQ), PQS, HQNO, and AHLs produced after 20 h of growth. Pyocyanin production in these cultures was also measured, as described in the Materials and Methods section. The stimulation of *S. aureus* biofilm formation was found significantly associated with the concentrations of HQNO ($r = 0.7511$, $P < 0.0001$) and PQS ($r = 0.9087$, $P < 0.0001$) in *P. aeruginosa* supernatants, according to Pearson's correlation coefficients (Fig. 2A and 2B). Also, we confirmed that the production levels of HQNO and PQS by *P. aeruginosa* isolates are closely correlated (Fig. 2C, $r = 0.8318$, $P < 0.0001$). As expected, conditions in which biofilm was significantly increased, planktonic bacterial growth was greatly attenuated (data not shown). On the other hand, there was a poor correlation between the concentration of pyocyanin, HHQ or AHLs found in a supernatant and its ability to promote biofilm production by *S. aureus* (Fig. S2). AHLs were not detected in an important proportion of the supernatants analyzed, as C4-HSL was quantified in 58% of the cultures whereas the presence of 3-oxo-C12-HSL was only observed in 19% of the *P. aeruginosa* isolates. (Table S1). Interestingly, the level of rhamnolipids measured in the *P. aeruginosa* supernatants showed a high positive correlation with the capacity to increase biofilm in strain CF1A-L (Fig. 2D, $r = 0.7344$, $P < 0.0001$).

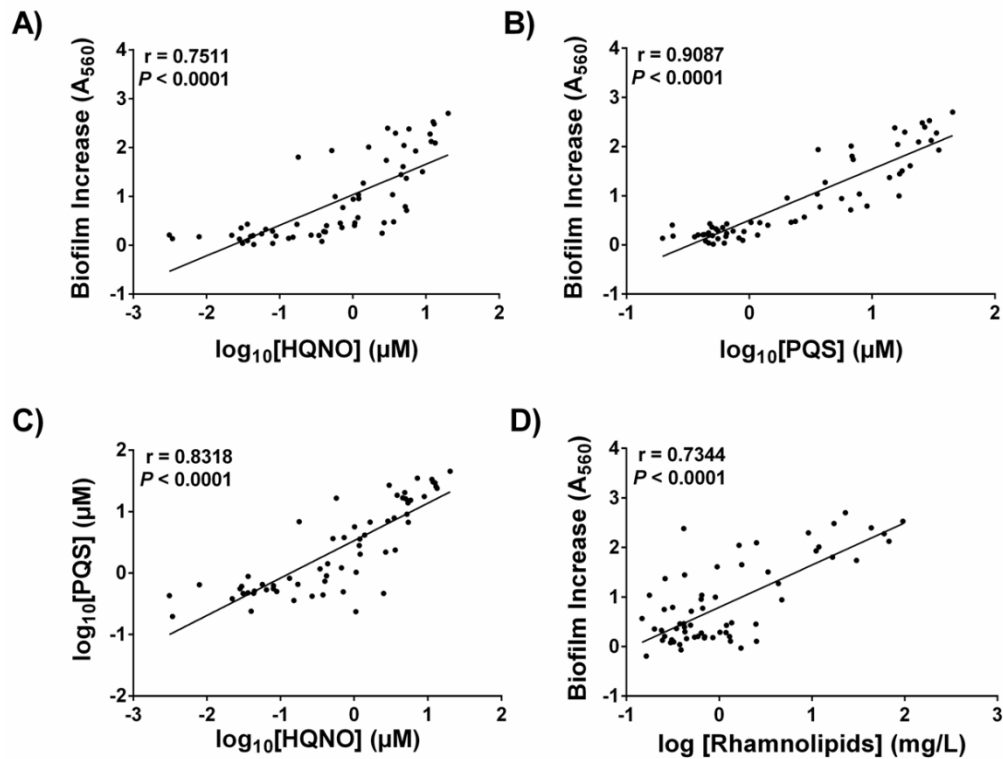


Figure 2. *P. aeruginosa* exoproducts associated with *S. aureus* biofilm stimulation. The ability of *P. aeruginosa* supernatants to stimulate *S. aureus* CF1A-L biofilm formation is correlated with the concentrations of HQNO and PQS. LC/MS was used to detect and quantify specific exoproducts in 20-h culture supernatants of clinical isolates of *P. aeruginosa*. The increase of *S. aureus* biofilm production by *P. aeruginosa* supernatants was calculated as described in Fig. 1C and plotted against the Log10 concentrations of (A) HQNO and (B) PQS found in each supernatant. Pearson's correlation coefficients are indicated and statistical significance was determined by two-tailed P value. (C) Correlation between HQNO and PQS production by *P. aeruginosa* isolates using Pearson's calculation. (D) Rhamnolipids amounts produced by *P. aeruginosa* isolates are highly correlated with CF1A-L biofilm increase (Pearson's correlation, two-tailed P value).

Isogenic mutants of strain *P. aeruginosa* PA14 altered in the biosynthesis of AQs (Table 1) were then used to confirm or complement our observations. As mentioned above, the culture supernatant of PA14 elicited a great stimulation of *S. aureus* CF1A-L biofilm formation that was statistically significant in comparison to the *E. coli* negative control ($P < 0.0001$; Fig. 3A). A significant loss of biofilm induction capacity was observed with the supernatants of the *lasR/rhlR* mutant, altered in the biosynthesis of AHLs and the AQ molecules PQS and HQNO ($P < 0.0001$), and of the *pqsA* mutant, deficient in all AQ production ($P < 0.001$) (Fig. 3A). This was also the case for the *pqsL* mutant showing a significant reduction in its biofilm stimulation ability ($P < 0.05$), thus confirming that HQNO is of utmost importance in the biofilm stimulation process. In addition to the observed correlation between the amount of PQS or HQNO produced by *P. aeruginosa* strains and the biofilm stimulatory activity (Fig. 2), results with the *pqsH* mutant also implies some implication of PQS in biofilm stimulation since this mutant showed a slight decrease in its biofilm stimulatory effect compared to the prototypical PA14 strain (Fig. 3A). Experiments conducted with synthetic PQS (Sigma) showed supporting results since this compound alone did not show any significant effect on *S. aureus* CF1A-L biofilm formation but in combination with HQNO, greatly increased biofilm production to levels appearing higher than those seen with HQNO (Fig. 3B). The latter results act as a chemical confirmation of the specific role of HQNO in the stimulation of *S. aureus* biofilm formation by *P. aeruginosa*. Besides, our results do not suggest that the presence of the regulator protein PqsE or pyocyanin is linked to *S. aureus* biofilm stimulation since the *pqsE* mutant was not altered in its biofilm stimulation ability (Fig. 3A). Similarly, the *rhIA* mutant induced similar *S. aureus* biofilm stimulation than that observed with PA14, suggesting that rhamnolipids are also not implicated in this phenomenon (Fig. 3A).

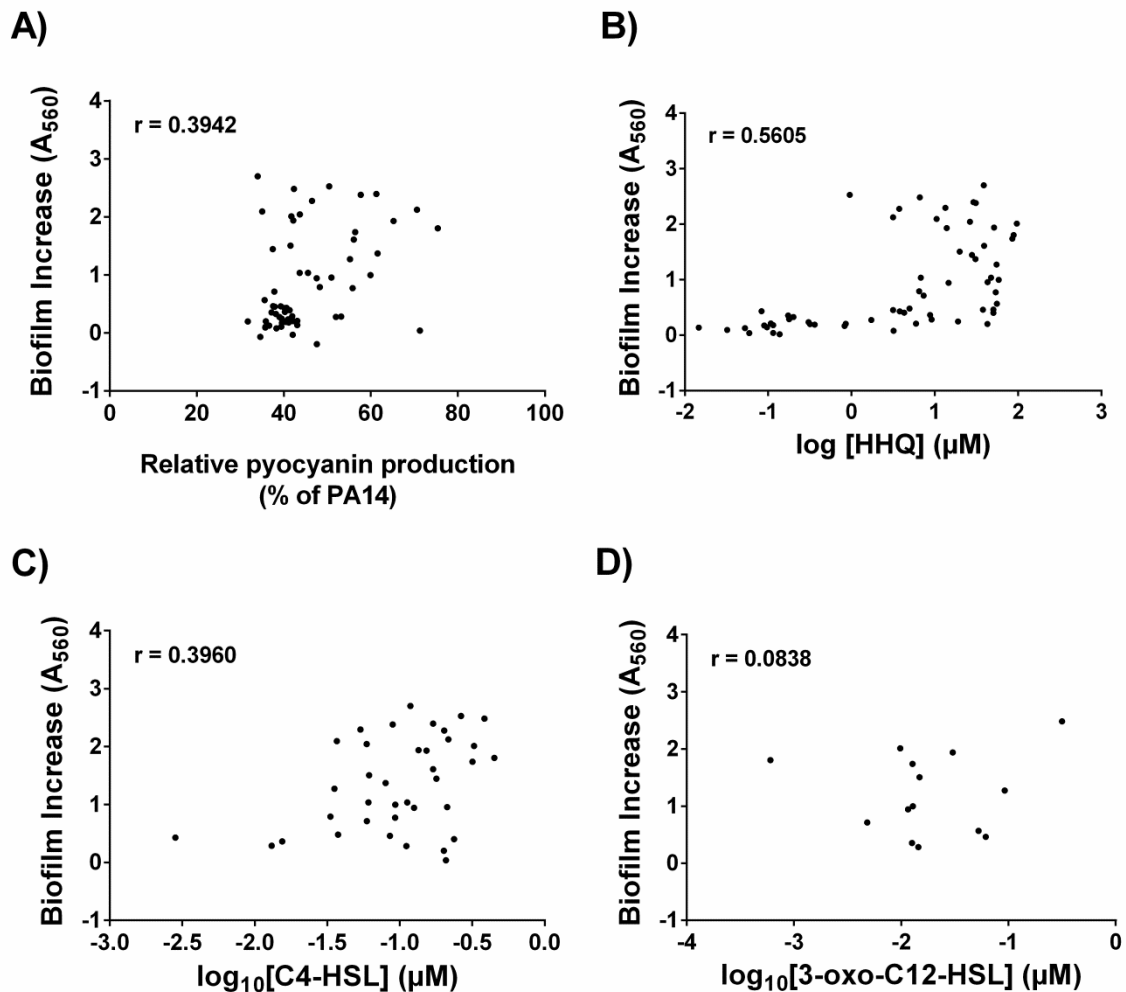


Figure S2. Biofilm increase in function of signal molecules and pyocyanin production A) *S. aureus* CF1A-L biofilm formation in function of pyocyanin production by *P. aeruginosa* isolates. Pyocyanin production by each isolate is reported relative to *P. aeruginosa* PA14's production (100%). B) CF1A-L biofilm formation in function of HHQ levels produced by *P. aeruginosa* isolates. C) CF1A-L biofilm increase in function of C4-HSL and D) 3-oxo-C12-HSL levels detected in *P. aeruginosa* supernatants. Pearson's correlations (r) are shown.

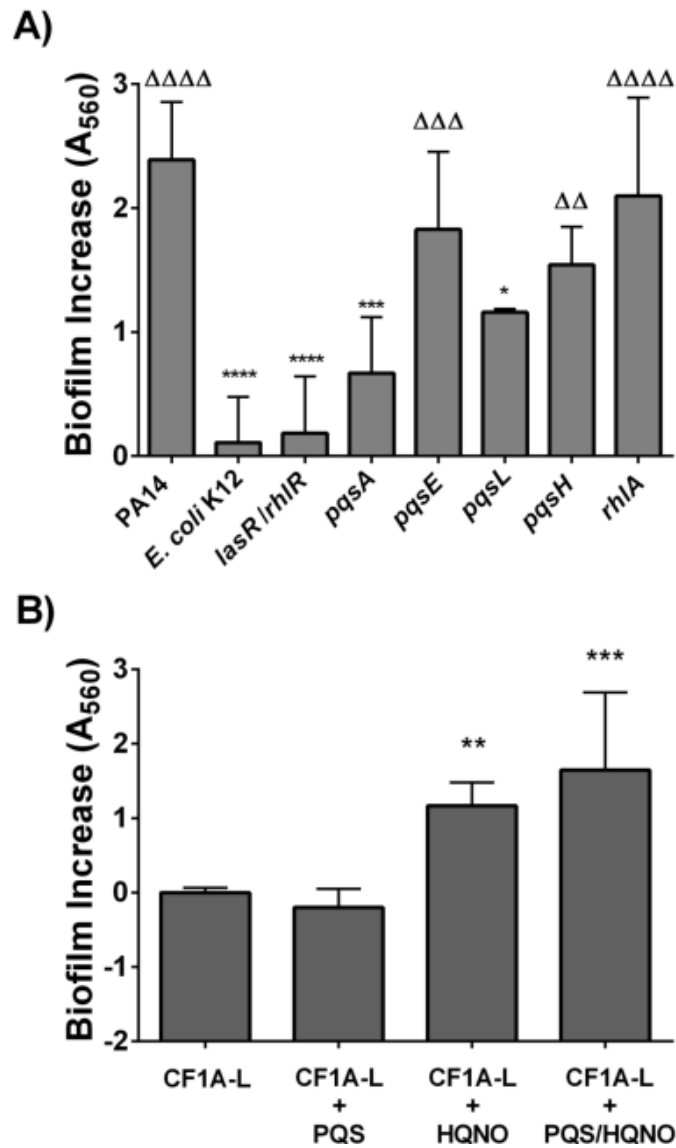


Figure 3. HQNO confirmed as main component in *S. aureus* biofilm stimulation. (A) Stimulation of *S. aureus* CF1A-L biofilm production in response to culture supernatants of *P. aeruginosa* PA14 and isogenic mutants. The supernatant of *E. coli* K12 was used as negative control. Data are presented as means with standard deviations for at least three independent experiments. Statistical significance of results are presented in comparison to those obtained with strain PA14 (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$) and *E. coli* K12 (ΔΔ, $P < 0.01$; ΔΔΔ, $P < 0.001$; ΔΔΔΔ, $P < 0.0001$) as calculated by a one-way ANOVA and Bonferroni's

multiple comparison test. (B) Biofilm increase (means of total $A_{560\text{nm}}$ variations) measured at different concentrations (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of either PQS, HQNO or a PQS/HQNO mixture (1:1) compared to that measured for *S. aureus* CF1A-L grown without supplement. Significant biofilm increases in each condition are indicated (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) as calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

2.6.3 *P. aeruginosa* strains do not stimulate biofilm formation of co-isolated *S. aureus* strains

S. aureus biofilm stimulation assays were also performed using *S. aureus* isolates retrieved from patients that were co-colonized with *P. aeruginosa*. Unexpectedly, *P. aeruginosa* isolates showing the highest biofilm stimulatory activities on CF1A-L (*i.e.*, those showing the highest production of HQNO; Fig. 1C) were unable to maintain this trait toward their respective co-isolates (Fig. 4A). We found, as before, a strong correlation between biofilm stimulation of CF1A-L and HQNO levels in the *P. aeruginosa* supernatants ($r = 0.8921$, Pearson's correlation calculation; $P < 0.0001$, two-tailed) but no correlation was found ($r = -0.32$) when the same supernatants were tested with their respective co-isolated *S. aureus* (Fig. 4A). In other words, the correlation between HQNO production and the stimulation of *S. aureus* biofilm production is lost when *P. aeruginosa* and *S. aureus* co-isolates are tested together.

Very interestingly, both the lack of stimulation of some *S. aureus* strains by high levels of HQNO and the lack of adequate production of HQNO by some *P. aeruginosa* strains could explain the lack of biofilm stimulatory effect among co-isolates. Fig. 4B shows a specific example of an *S. aureus* isolate (CF22A-L) that is

not stimulated for biofilm production by either PA14 or its co-isolate (*P. aeruginosa* PAC22A) despite adequate production of HQNO and biofilm stimulation of the *S. aureus* reference strain CF1A-L. Similarly, 28.5% (6/21) of all the *S. aureus* co-isolates did not respond to PA14 stimulation although they were co-isolated with *P. aeruginosa* isolates causing significant stimulation of *S. aureus* CF1A-L. On the other hand, Fig. 4C shows an example of the other scenario where the supernatant from strain *P. aeruginosa* PAC54A does not increase biofilm formation of either its co-isolate *S. aureus* CF54A-L or the reference strain *S. aureus* CF1A-L while the biofilm production of both *S. aureus* strains is greatly increased by a supernatant of PA14. Indeed, the supernatant from strain *P. aeruginosa* PAC54A only contains 4% of the amount of HQNO produced in a supernatant from PA14 as determined by LC/MS. Overall, 73.9% (17/23) of the *P. aeruginosa* co-isolates produced relatively low amounts of HQNO and were poorly able to stimulate *S. aureus* CF1A-L biofilm production (as determined by Sidak's multiple comparisons test; Fig. 1C). Consequently, considering the *S. aureus* strains that do not respond to HQNO and the low-HQNO-producing *P. aeruginosa*, none of the co-isolated *S. aureus* showed biofilm augmentation when in presence of supernatants obtained by their specific *P. aeruginosa* counterparts.

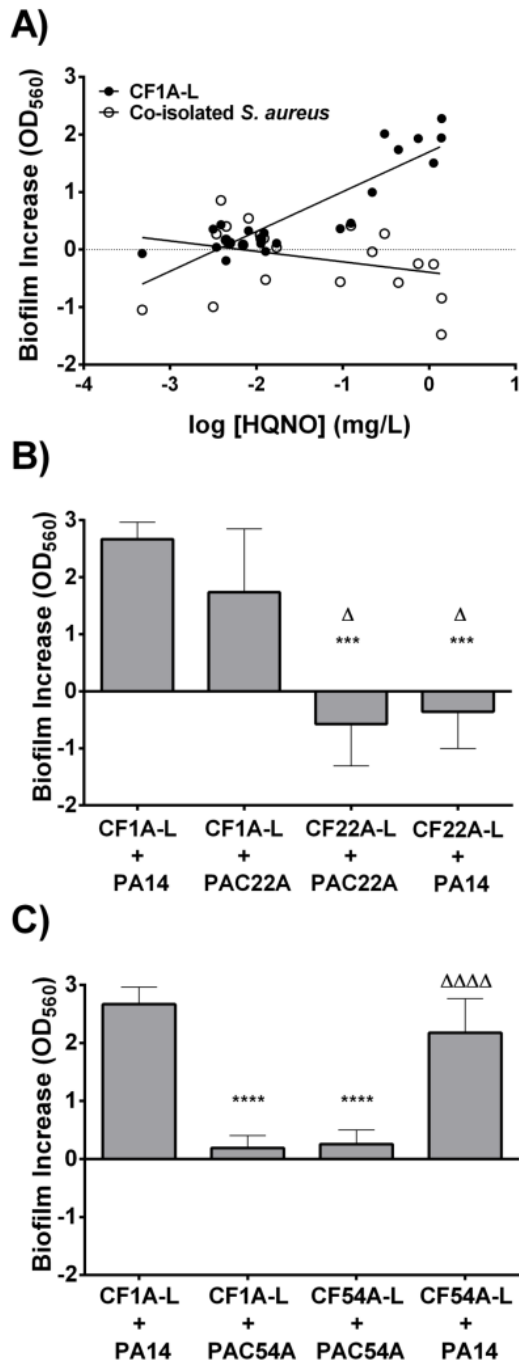


Figure 4. Altered response of co-isolated strains. Stimulation of *S. aureus* CF1A-L biofilm production by *P. aeruginosa* culture supernatants compared to that measured for *S. aureus* strains originally co-isolated with the studied *P. aeruginosa* isolates. (A)

Correlation between HQNO production by *P. aeruginosa* strains and stimulation of *S. aureus* CF1A-L biofilm production (●) compared to that of *S. aureus* strains originally co-isolated with the studied *P. aeruginosa* isolates (○). No significant correlation is observed in the response of *S. aureus* co-isolates to the amounts of HQNO found in *P. aeruginosa* supernatants ($r = -0.32$, Pearson's calculation) whereas a significant correlation is seen for *S. aureus* CF1A-L ($r = 0.8921$; $P < 0.0001$). (B) Specific example of an *S. aureus* isolate (CF22A-L) that is not stimulated for biofilm production by either PA14 or its *P. aeruginosa* co-isolate (PAC22A). There is no stimulation of biofilm production by *S. aureus* CF22A-L in comparison to that observed for *S. aureus* CF1A-L in the presence of supernatant from *P. aeruginosa* PA14 (***, $P < 0.001$) or co-isolate PAC22A (Δ , $P < 0.05$; one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test). (C) *P. aeruginosa* PAC54A supernatant does not increase biofilm formation of either *S. aureus* CF1A-L or its co-isolate *S. aureus* CF54A-L even though both *S. aureus* strains have their biofilm production greatly increased by the *P. aeruginosa* PA14 supernatant. Results obtained with *S. aureus* CF1A-L were used as control and significant differences between conditions are shown for both supernatants used, PA14 (****, $P < 0.0001$) or PAC54A ($\Delta\Delta\Delta\Delta$, $P < 0.0001$).

All together, this suggests that some type of strain selection within the host or some type of interspecific adaptations providing either a tolerance of *S. aureus* to HQNO or a decrease production of stimulatory exoproducts by *P. aeruginosa* can occur with these bacterial species during colonization or co-colonization of CF lungs.

2.6.4 Effect of co-colonization on FEV1

The respiratory health, expressed by FEV1 values for each patient at the time of sampling has been compiled. FEV1 values were segregated into three groups in

relation to the bacterial species colonizing the respiratory tract (Fig. 5). Although the overall number of patients for such analysis is relatively low, we note that the group of patients from which both *S. aureus* and *P. aeruginosa* were simultaneously retrieved shows the poorer breathing capacity (mean FEV1). Four patients were colonized by MRSA and only one was co-colonized with *P. aeruginosa* (Fig. 5). These results suggest that co-colonization worsens the patient health, although statistical significance was only observed between the *S. aureus* group and the *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-colonized group.

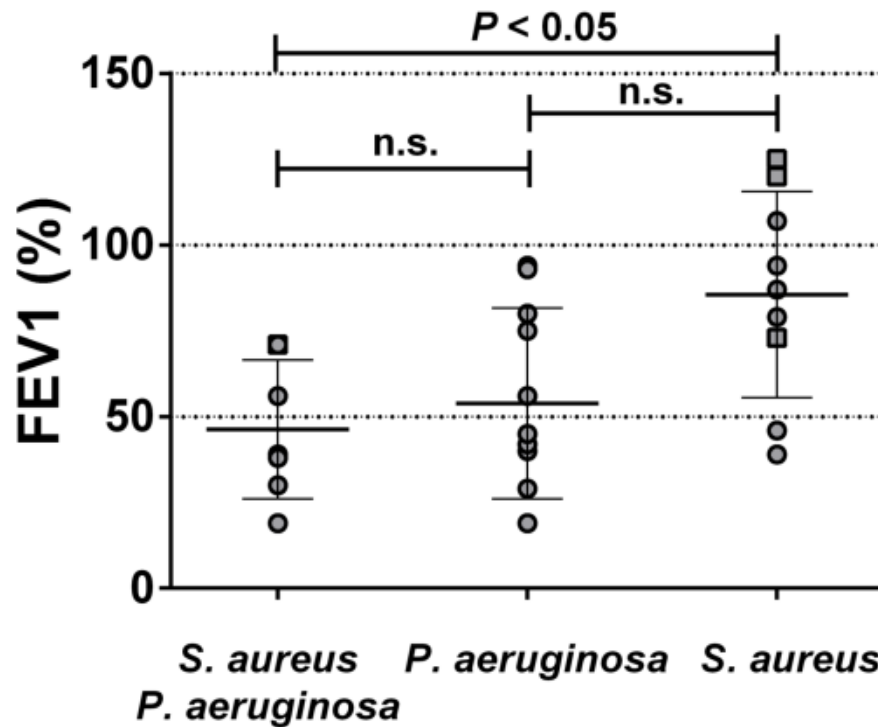


Figure 5. Health condition of co-colonized patients. FEV1 values in patients colonized with one or both pathogens. Each dot represents the FEV1 of a patient. Square symbols represent patient colonized by a MRSA strain. Bars show the means with standard deviations. Groups were compared using a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (ns: non-significant).

2.7 DISCUSSION

We gathered a collection of 63 clinical *P. aeruginosa* isolates retrieved from the respiratory tract of 32 adult CF patients over a period of three years. From those isolates, 23 were collected from patients in whom *S. aureus* was also found co-infecting with *P. aeruginosa*. This collection thus offered a unique strain panel for investigations on the properties of *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-isolates.

It was previously demonstrated that the *P. aeruginosa* exoproduct HQNO promotes the emergence of *S. aureus* small colony variants (SCVs) and importantly increases biofilm formation by prototypical *S. aureus* [16,18]. Since biofilm are associated with chronic and difficult to eradicate infections [13,25], we were therefore interested to know if a similar phenomenon could be observed with clinical isolates of both *S. aureus* and *P. aeruginosa*; in other words, to know if one species could influence some aspects of the other species colonization or pathogenesis in general.

By treating cultures of *S. aureus* strain CF1A-L with culture supernatants from the *P. aeruginosa* strain collection, we were able to demonstrate a broad range of biofilm stimulatory abilities among the clinical isolates of *P. aeruginosa*; some greatly stimulated *S. aureus* biofilm production while others did not. Noteworthy, isolates that were retrieved from same patients showed not only different morphotypes, but also different biofilm stimulatory activity on *S. aureus* CF1A-L. We subsequently used LC/MS analysis to precisely determine the types and concentrations of *P. aeruginosa* exoproducts present in culture supernatants and to identify those most likely responsible for the stimulation of *S. aureus* biofilm production. LC/MS results showed that the capacity to stimulate *S. aureus* biofilm formation was strongly associated to the production of the two most abundant Aqs, HQNO and PQS. Since biosyntheses

of HQNO and PQS are simultaneously derived from the same main pathway [37,38], we used isogenic mutants deficient in some parts of the biosynthesis pathways and signaling mechanisms to further decipher the contributions of HQNO and PQS. The observation that the *pqsA* mutant, deficient in both PQS and HQNO production, demonstrates poorer biofilm stimulation than that observed using either of the *pqsH* or *pqsL* mutants deficient in PQS or HQNO production, respectively, supports some contribution of both PQS and HQNO to the *S. aureus* biofilm stimulatory activity. Besides, the fact that *pqsH* is less affected than *pqsL* in its ability to promote biofilm formation tends to indicate a greater role for HQNO. However, confounding factors may impact on such deductions. For example, the *pqsL* mutant accumulates precursors that may increase the proportions of other AQs. Also, a blocked production of PQS in the *pqsH* mutant will certainly impact on the expression of the *pqsABCDE* operon, as PQS is known to act as an inducer *in vitro*.

Since the double mutant *lasR/rhlR* is even more affected than *pqsA* in its ability to stimulate *S. aureus* biofilm formation, other factors, others than the AQs controlled by *pqsA/pqsE*, may also be involved. AHLs could represent good candidates as they were described to inhibit *agr* controlled phenotypes in *S. aureus* [7] and are regulated through the *lasR*-dependent quorum-sensing in which mutations in CF related isolates have been widely discussed [48,49,50]. It is also possible that other AQs from the long list of such molecules produced by *P. aeruginosa* [38] also play some role in *S. aureus* biofilm stimulation. A phenazine could also be involved but pyocyanin production did not correlate with biofilm stimulation and the *pqsA* and *pqsE* mutants produce less or no pyocyanin at all. We have also ruled out rhamnolipids (no difference between PA14 and the *rhlA* mutant, Fig. 3A). Besides, it has been reported that *P. aeruginosa* rhamnolipids could act as surfactant molecules capable of disrupting biofilms produced by Gram positive bacteria, such as *S. aureus* [51,52]. Therefore, it would be interesting to document *S. aureus* CF1A-L apparent resilience to biofilm disruption (Fig. 3A) although we need to consider that rhamnolipids were

not optimally produced in our experimental conditions (medium used and time of supernatant harvesting). This may need to be revisited in another experimental setup or with the use of purified rhamnolipids. Hence, the stimulation of *S. aureus* biofilm production by *P. aeruginosa* seems multifactorial and controlled by *lasR/rhlR*, with HQNO being one of the principal actors in this phenomenon.

To our knowledge, very few studies have examined the interactions of co-isolates of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Interestingly, we demonstrated here that although some *P. aeruginosa* isolates produce adequate amounts of HQNO and stimulate biofilm production of the *S. aureus* control strain CF1A-L, such *P. aeruginosa* isolates were unable to induce the same effect on the co-isolated *S. aureus* strains. Our results also demonstrated the opposite situation in which PA14 HQNO-sensitive *S. aureus* isolates were co-isolated with *P. aeruginosa* strains producing low concentrations of HQNO. Overall, these results suggest that colonization of the lungs of CF patients promotes some type of strain selection or the adaptation of either one of these pathogens to the presence of the other. These adaptations may, in one of the two scenarios, provide *S. aureus* with the ability to tolerate more efficiently the presence of pseudomonal compounds, such as HQNO that can reduce growth. In the second scenario, a deficiency of HQNO production in *P. aeruginosa* could be the result of the lung environment [48,49,53] or the production of 2-amino acetophenon [54], which have been reported to select for the emergence of *lasR* mutants. Indeed, absence of *lasR* results in reduced HQNO production [37]. On the other hand, the presence of *S. aureus* and its increased biofilm formation resulting from the production of HQNO may also provide some pressure on *P. aeruginosa* for selection of HQNO-deficient strains. We propose that the coexistence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in CF patients results from an adaptive process, notably in the interspecific interactions involving HQNO. Similarly, it has been observed that some *P. aeruginosa* genetic mutations leading to an up-regulation of siderophore production can occur in the presence of *S. aureus* in iron-limiting

conditions [55]. As for the ability of *S. aureus* to adapt to the presence of *P. aeruginosa*, we suspect that the alternative SigB factor may play an important role. Indeed, we have already shown that *S. aureus* SigB can promote host colonization, emergence of SCVs and biofilm formation in response to antibiotic treatment and HQNO [18,56,57]. Our study supports the emerging perspective of a coadaptation and interspecies cooperation that is largely contrasting with studies focusing on the competitive/inhibitory interactions between both bacterial species [6,16,17,58,59]. Hence, our findings are in accordance with the fact that *S. aureus* and *P. aeruginosa* are often found together in CF lungs [3,16,60,61].

Studying microbial interactions and adaptive processes leading to co- or poly-bacterial infections is now evidently important. Traditional microbiology revealed *S. aureus*-positive samples in 56% of the cases in our sputum collection, whereas, PCR detection revealed *S. aureus* in as much as 77% of the samples. In contrast, *P. aeruginosa* was similarly detected in 65% and 71% of samples by microbiology and PCR, respectively. Consequently using PCR, *S. aureus* and *P. aeruginosa* co-isolate pairs were detected in 52% of cases instead of 25% (data not shown). This shows that the presence of *S. aureus* in the CF lungs of adult patients may often be underestimated and our results suggest that the co-existence of *P. aeruginosa* and *S. aureus* may potentially impact on the patient health (Fig. 5). A recent study involving many more patients observed that MRSA might be more deleterious than MSSA only when associated with *P. aeruginosa* [62]. However, it is still difficult to know if CF infections involving “adapted” *S. aureus* (or MRSA) and *P. aeruginosa* co-isolates, as opposed to prototypical “competitive” isolates, can result in a worse or better prognosis. Nevertheless, our study implies that each patient will present specific bacterial isolates with distinct properties [63]. Future patient-specific therapies may need to account for *P. aeruginosa* and *S. aureus* co-isolates’ characteristics and take into consideration possible therapy-induced disturbances in the microbiota.

2.8 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from Cystic Fibrosis Canada. Work in ED lab was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grant MOP-97888. We wish to thank all CF patients involved in this study for their willingness and enthusiasm in participating to this research project. We also thank Josée Lessard from the CF clinic and the personnel from the clinical microbiology laboratory of the CHUS for the initial characterization of the microbial isolates.

2.9 REFERENCES

1. Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE (2005) Human polymicrobial infections. *Lancet* 365: 253-255.
2. CysticFibrosisCanada (2011) Canadian Cystic Fibrosis Patient Data Registry Report 2009.
3. CysticFibrosisCanada (2010) Canadian Cystic Fibrosis Patient Data Registry Report 2008.
4. Kerem E, Viviani L, Olesen HV (2006) Registry Report on 2003 data ECFS.
5. Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol* 50: 1477-1491.
6. Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J Bacteriol* 187: 554-566.
7. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, et al. (2006) N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74: 910-919.
8. Riedel K, Ohnesorg T, Krogfelt KA, Hansen TS, Omori K, et al. (2001) N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 183: 1805-1809.
9. Ryan RP, Dow JM (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154: 1845-1858.
10. Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, et al. (2008) A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15070-15075.
11. Weaver VB, Kolter R (2004) *Burkholderia* spp. alter *Pseudomonas aeruginosa* physiology through iron sequestration. *J Bacteriol* 186: 2376-2384.

12. Yang L, Liu Y, Markussen T, Hoiby N, Tolker-Nielsen T, et al. (2011) Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 339-347.
13. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15: 194-222.
14. Mitchell G, Malouin F (2012) Outcome and Prevention of *Pseudomonas aeruginosa*-*Staphylococcus aureus* Interactions During Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. In: Sriramulu D, editor. *Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research*: Intech. pp. 550.
15. Goerke C, Wolz C (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*.
16. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, et al. (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19890-19895.
17. Machan ZA, Taylor GW, Pitt TL, Cole PJ, Wilson R (1992) 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 30: 615-623.
18. Mitchell G, Seguin DL, Asselin AE, Deziel E, Cantin AM, et al. (2010) *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* 10: 33.
19. Boles BR, Horswill AR (2008) Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4: e1000052.
20. Kim JH, Kim CH, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, et al. (2008) Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J Microbiol Biotechnol* 18: 28-34.
21. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS (2003) Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 71: 4206-4211.
22. Irie Y, O'Toole G A, Yuk MH (2005) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 250: 237-243.

23. Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, et al. (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* 81: 316-322.
24. Zezzi do Valle Gomes M, Nitschke M (2012) Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control* 25: 441-447.
25. Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292: 107-113.
26. Chalmers JD, Hill AT (2012) Mechanisms of immune dysfunction and bacterial persistence in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Mol Immunol*.
27. Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, et al. (2012) Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* 8: e1002843.
28. Archibald LK, Gaynes RP (1997) Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons. *Infect Dis Clin North Am* 11: 245-255.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
30. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.
31. Straight PD, Kolter R (2009) Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu Rev Microbiol* 63: 99-118.
32. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
33. Oliver A, Mena A (2010) Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 16: 798-808.
34. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N (2005) Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is

associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2276-2282.

35. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
36. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, et al. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
37. Deziel E, Lepine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, et al. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1339-1344.
38. Lepine F, Milot S, Deziel E, He J, Rahme LG (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Soc Mass Spectrom* 15: 862-869.
39. Xiao G, Deziel E, He J, Lepine F, Lesic B, et al. (2006) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* 62: 1689-1699.
40. Dekimpe V, Deziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155: 712-723.
41. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, et al. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2833-2838.
42. Hammerschlag MR, Harding L, Maccone A, Smith AL, Goldmann DA (1980) Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. *J Clin Microbiol* 11: 552-557.
43. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, et al. (2007) Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol* 117: 99-105.

44. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, et al. (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 2240-2244.
45. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, et al. (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 41: 1801-1804.
46. Lépine F, Déziel E (2010) Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Detection and Quantification of N-Acyl-L-Homoserine Lactones and 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines #. *T Quorum Sensing*. pp. 61-69.
47. Lépine F, Déziel E (2011) Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Detection and Quantification of N-Acyl-L-Homoserine Lactones and 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines. In: Rumbaugh KP, editor. *Quorum Sensing*: Humana Press. pp. 61-69.
48. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, et al. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8487-8492.
49. D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Deziel E, et al. (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* 64: 512-533.
50. Wilder CN, Allada G, Schuster M (2009) Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun* 77: 5631-5639.
51. Pihl M, Arvidsson A, Skepo M, Nilsson M, Givskov M, et al. (2013) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on peritoneal dialysis catheters and the effects of extracellular products from *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis* 67: 192-198.
52. Dusane DH, Nancharaiyah YV, Zinjarde SS, Venugopalan VP (2010) Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 81: 242-248.
53. Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Hoiby N (2010) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of

patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology* 156: 1108-1119.

54. Kesarwani M, Hazan R, He J, Que YA, Apidianakis Y, et al. (2011) A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS Pathog* 7: e1002192.
55. Harrison F, Paul J, Massey RC, Buckling A (2008) Interspecific competition and siderophore-mediated cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 2: 49-55.
56. Mitchell G, Brouillette E, Seguin DL, Asselin AE, Jacob CL, et al. (2010) A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog* 48: 18-27.
57. Mitchell G, Lamontagne CA, Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, et al. (2008) *Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* 70: 1540-1555.
58. Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M (2005) Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol* 187: 5267-5277.
59. Hendricks KJ, Burd TA, Anglen JO, Simpson AW, Christensen GD, et al. (2001) Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds. *J Bone Joint Surg Am* 83-A: 855-861.
60. Paixao VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, et al. (2010) Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz J Infect Dis* 14: 406-409.
61. Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153: 917-923.
62. Hubert D, Reglier-Poupet H, Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Le Bourgeois M, et al. (2013) Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with

Pseudomonas aeruginosa and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*.

63. Stressmann FA, Rogers GB, van der Gast CJ, Marsh P, Vermeer LS, et al. (2012) Long-term cultivation-independent microbial diversity analysis demonstrates that bacterial communities infecting the adult cystic fibrosis lung show stability and resilience. *Thorax* 67: 867-873.

CHAPITRE 3

CO-EXISTENCE

3.1 Établissement d'un biofilm mixte combinant *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Toujours dans l'intérêt de définir la relation existante entre les deux espèces dans l'établissement d'une infection chronique, de façon à décrire le développement de réponses réciproques entre les populations bactériennes, il était pertinent d'observer les deux bactéries évoluer dans un environnement commun. Comme le biofilm est un mode de colonisation bien documenté en FK, notamment dans son rôle d'ancrage au mucus épais des régions pulmonaires, la construction d'un modèle *In vitro* sous forme de biofilm mixte (double-espèce) semblait appropriée. Afin de recenser la présence de modifications phénotypiques ou génotypiques chez les deux pathogènes d'intérêt durant la progression d'une exposition réciproque d'une durée considérable, comme dans le contexte d'une infection chronique, nous avons développé une procédure permettant de maintenir une coexistence soutenue durant plusieurs reprises d'un cycle de 24 heures.

Cette expérience a été développée avec les souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et *Staphylococcus aureus* CF07-L. Les bactéries ont d'abord été ensemencées sur Petri et incubées O/N à 35°. À partir de ces cultures, des suspensions bactériennes de 10 ml ont été préparées avec chacune des espèces dans du milieu TSB à des densités de 1×10^7 et 1×10^8 UFC/ml pour *P. aeruginosa* et *S. aureus*, respectivement. Les densités bactériennes utilisées comme inocula de départ ont été déterminées lors d'expériences préliminaires qui avaient

démontré qu'avec un inoculum équivalent pour chaque espèce permettait à *P. aeruginosa* de décimer *S. aureus* étant donné son taux de croissance plus rapide. 5 ml de chacune des suspensions ont été combinés et déposés dans un Petri traité pour la culture de cellules adhérentes. L'établissement du biofilm mixte a été conduit à 35°C, de façon statique, pendant 24 heures. À l'aide d'un grattoir à cellules, le biofilm a été homogénéisé avec le milieu de culture résiduel et par la suite, récolté. L'homogénat de culture a été dilué sériellement et un dénombrement bactérien fut effectué sur géloses sélectives. Un milieu TSA supplémenté de Polymixin B fut utilisé pour l'isolement de *S. aureus* tandis que l'emploi de géloses MacConkey permit d'isoler *P. aeruginosa*. Des groupements d'UFC totales de chaque bactérie ont été conservés et ont servi de matériel pour l'inoculum de départ du passage subséquent. Ce processus fut répété pendant une vingtaine de passages expérimentaux. Parallèlement, différentes conditions contrôles furent conduites de la même façon. Tout d'abord, afin de discriminer des changements phénotypiques potentiellement issus du processus de passages successifs plutôt que de la coexistence, chaque pathogène a subi le même processus de façon individuelle, dans des récipients contenant seulement du milieu de culture. *S. aureus* CF07-L a également été utilisée dans deux autres versions de cette expérience dans lesquelles la fraction de culture représentée par *P. aeruginosa*, dans l'expérience principale, fut remplacée soit par un surnageant de culture de PA14 ou du milieu supplémenté de HQNO (Axxora) 10 µg/ml. Ces deux dernières conditions contrôles ont été basées sur les impacts possibles que l'on connaît des exoproduits de *P. aeruginosa* sur le comportement de *S. aureus*, notamment sur sa production de biofilm. De plus, ces procédures nous permettront de vérifier si seule la présence d'exoproduits pourrait influencer phénotypiquement la souche co-représentée et si l'influence diffère en comparaison avec celles potentiellement détectées dans le biofilm mixte regroupant individus des deux espèces. Tout comme dans les expériences principales précédemment détaillées, groupements et dénombrement d'UFC totaux furent comptabilisés et conservés à chacun des différents passages.

3.2 Caractérisation des suivis de coexistence en biofilm mixte de *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Dans leur ensemble, les expériences *in vitro* conduites dans le but de caractériser l'effet de coexistence ont mené à la récolte d'une banque de 160 groupements bactériens. De ceux-ci, 60 sont constitués de *P. aeruginosa* et 100 de *S. aureus*, échantillonnés lors de différents passages et dans les différentes conditions. Pour chacun de ces groupements, trois différents clones de chacun des phénotypes de croissance recensés sur Petri ont été conservés à -80°C. Le principal intérêt de mener les deux suivis de coexistence en biofilm mixte était de cibler des évènements marquants ou témoignant d'une quelconque adaptabilité réciproque ou unilatérale entre les deux espèces. De ce fait, des changements comportementaux ou phénotypiques, autres que morphologiques, ont été recherchés par l'étude de nombreux facteurs de virulence connus chez une sélection de clones issus de la coexistence *in vitro*. Étant donné la grande quantité de clones différents isolés lors de ce cheminement, l'analyse complète de tous les isolats s'avérait très complexe et fastidieuse. Pour cette raison, une sélection de clones isolés lors de certains passages a été effectuée suite à l'observation des profils de croissance des deux bactéries regroupant tous les passages. Les deux expériences effectuées en biofilm mixte ont été analysées de façon individuelle. Les résultats de dénombrements bactériens obtenus en UFC/ml lors du suivi #1 démontrent des fluctuations de la présence de *S. aureus* (Fig 3.1A). De façon intéressante, au cours des 20 passages, la charge bactérienne représentée par *S. aureus* après 24h de co-culture statique a été retrouvée de façon inférieure, comparable ainsi que supérieure à la confluence de l'inoculum de départ ($5,0 \times 10^7$ UFC/ml). De plus, les proportions décelées et représentées sous forme de pourcentage de la charge microbienne totale récupérée après 24 heures démontrent bien que lors de certains passages du biofilm, *S. aureus*

fut représenté à des niveaux comparables à ceux détectés pour *P. aeruginosa*, mais également à des niveaux radicalement inférieurs ou supérieurs (Fig 3.1B). Quant aux dénombrements bactériens effectués sur *P. aeruginosa*, ils s'avèrent être plutôt stables et témoignent d'une présence augmentée d'au moins 3 log₁₀UFC/ml comparativement à la population initiale (5,0 x10⁶ UFC/ml) à chacun des différents passages (Fig 3.1A). Contrairement à sa contre-partie, *P. aeruginosa* ne semble pas du tout affecté dans sa croissance de façon générale compte tenu de sa dominance quasi complète sur *S. aureus*, apparente par les concentrations bactériennes élevées détectées, allant jusqu'à 4,1 x 10¹¹ UFC/ml par moment (Fig 3.1A). Cela dit, il est à noter qu'au 12^e passage, après 24 heures sous les mêmes conditions, une recrudescence de *S. aureus* lui permet d'occuper 85,7 % du biofilm mixte total avec 7,8 x 10¹⁰ UFC/ml, alors que *P. aeruginosa* a décliné à 14,3 % avec 1,3 x 10¹⁰ UFC/ml (Fig 3.1A,B). Afin de représenter adéquatement l'ensemble de ces événements de la coexistence dans la recherche de phénotypes altérés, les passages sélectionnés pour l'analyse des clones isolés du suivi #1 sont les suivants : 1-2-4-9-12-13-17-20.

Par ailleurs, le suivi #2 de biofilm mixte fut analysé de la même façon. De façon surprenante, ce qui pouvait sembler être une succession d'évènements aléatoires dans le cadre du suivi #1 s'est avéré être des indicateurs de phénomènes semblables qui surviendraient lors du suivi #2. Une chute marquée de la charge bactérienne de *S. aureus* fut observée au passage 5 du suivi #2, qualitativement comparable à celle perçue au passage 4 du suivi #1 (Fig 3.1A, C). Dans les deux cas, une fluctuation qui semble présenter une tendance vers une stabilité est apparente chez *S. aureus*, plus particulièrement dans le cadre du suivi #2. Non seulement les populations dénombrées semblent se stabiliser lors des quatre derniers passages, leur niveau se rapproche grandement aux décomptes obtenus pour *P. aeruginosa* (Fig 3.1A, C). De toute évidence, la présence de *P. aeruginosa* semble occasionner moins d'impact sur la division de *S. aureus*, puisque cette

dernière fut récupérée à des niveaux apparentés à *P. aeruginosa*. Remarquons que les dénombrements en UFC/ml de *P. aeruginosa* n'ont pas diminué lors de ces quatre passages. C'est en effet plutôt *S. aureus* qui ont démontré une recrudescence de sa facilité à se diviser en présence de *P. aeruginosa*, démontrant une différence d'environ 4 log₁₀, passant de 7,9 x 10⁶ à 1,4 x 10¹⁰ UFC/ ml entre le 16^e et le 17^e passage (Fig 3.1C). En observant les proportions du biofilm mixte représentées par les deux espèces dans le suivi #2, on remarque quelques similarités avec les résultats obtenus dans le cadre du premier suivi. Tout comme dans le cadre du suivi#1, *P. aeruginosa* fut retrouvé de façon fortement majoritaire dans la plupart des passages expérimentaux effectués. Cela dit, les deux suivis sont marqués de certains évènements notables par une croissance plus marquée de *S. aureus*. En effet, les deux suivis démontrent des niveaux détections de *S. aureus*, notamment au passage P13 du suivi #1 et P14 du suivi #2, représentant des proportions du biofilm mixte nettement supérieures que celles observées durant les précédents (Fig 3.1B, D). De façon surprenante, les dénombrements de *P. aeruginosa* lors de ces mêmes passages ne diminuent pas de façon marquée, suggérant plutôt une plus grande croissance de *S. aureus* (Fig 3.1A, C).

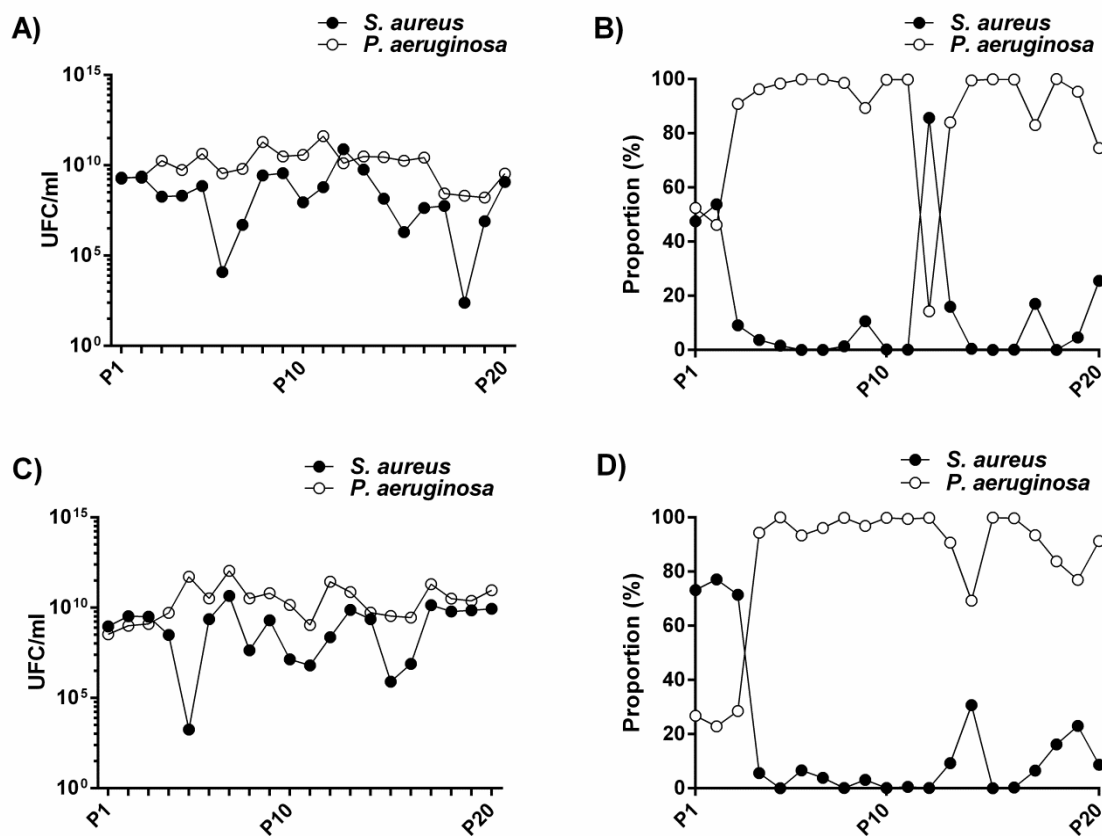


Figure 3.1 Suivi de la population bactérienne de *S. aureus* (●) et *P. aeruginosa* (○) après 24h de croissance en biofilm mixte suite aux passages séquentiels, représentés en A) UFC/ml et en B) proportion (%) pour la première expérience. La même analyse graphique de la deuxième expérience est représentée en C) et D).

3.3 Émergence de morphotypes séquentiels durant les passages en biofilm mixte

Durant les différents suivis effectués en biofilm statique, une attention particulière fut portée à la différenciation ou à l'apparition de phénotypes de croissance. L'aspect des colonies isolées sur boîtes de Petri à chacun des passages,

dans chacune des conditions, ainsi que leur abondance a été documentée. Aucune altération de phénotypes n'a été remarquée au niveau des conditions contrôles (mono-culture *P. aeruginosa*, mono-culture *S. aureus*, *S. aureus* avec HQNO, *S. aureus* avec surnageant PA14) (résultats non montrés). Ceci dit, différents aspects phénotypiques ont été décelés au moment de l'isolement des UFC dans le cadre des deux suivis effectués en co-culture mixte combinant *P. aeruginosa* PA14 et *S. aureus* CF07L. Premièrement, on a qualifié de «non mucoïde» un morphotype de colonie de *P. aeruginosa* qui a été observé pour la première fois au 3^e passage du premier suivi et qui présentait un aspect de colonie moins évasé que celui qu'on associait au typique PA14 (Fig 3.2 A, B). Le phénotype «non mucoïde» a représenté une proportion majoritaire à tous les passages où il a été détecté (Fig 3.2 A). Le phénotype «non mucoïde» a été retrouvé dans l'analyse des quatre derniers passages du suivi #1 et, selon les comptes d'UFC, les observations suggèrent que les charges représentées par les deux différents morphotypes de *P. aeruginosa* se rapprochent d'une équivalence (Fig 3.2 B).

. De façon intéressante, un phénomène semblable a été observé dans la réalisation du deuxième suivi de co-existence en biofilm mixte. Deux phénotypes de croissance sur Petri ont résulté des 20 passages de culture. Après seulement 3 passages, un nouveau phénotype à petites colonies est devenu dominant, représentant plus de 60% de la présence de *P. aeruginosa* (Fig 3.2 C). D'un aspect rugueux et de très petite taille, les colonies de ce nouveau phénotype respectent la définition proposée pour le phénotype «rugose Small Colony Variant» (RSCV), documenté précédemment (Starkey 2009). Le phénotype régulier associé à PA14 a été détecté durant la totalité des passages, de façon minoritaire (Fig 3.2 C). Le nombre d'UFC/ml comptabilisé pour le phénotype normal et le phénotype RSCV démontre une certaine stabilité pour la totalité du suivi, ce qui suggère qu'on observe l'émergence d'une sous-population de *P. aeruginosa* qui ne se dirige pas vers un remplacement de la population au phénotype normal (Fig 3.2 D). En comparant les

dénombrements totaux de *P. aeruginosa*, on a remarqué des nombres d'UFC supérieurs dans les deux suivis mixtes que dans la condition contrôle (PA14 seulement) (résultats non montrés).

Contrairement à *P. aeruginosa*, aucune sous-population de *S. aureus* n'a été constatée ni de changement visuel important de phénotype n'a été observé dans aucune des conditions testées.

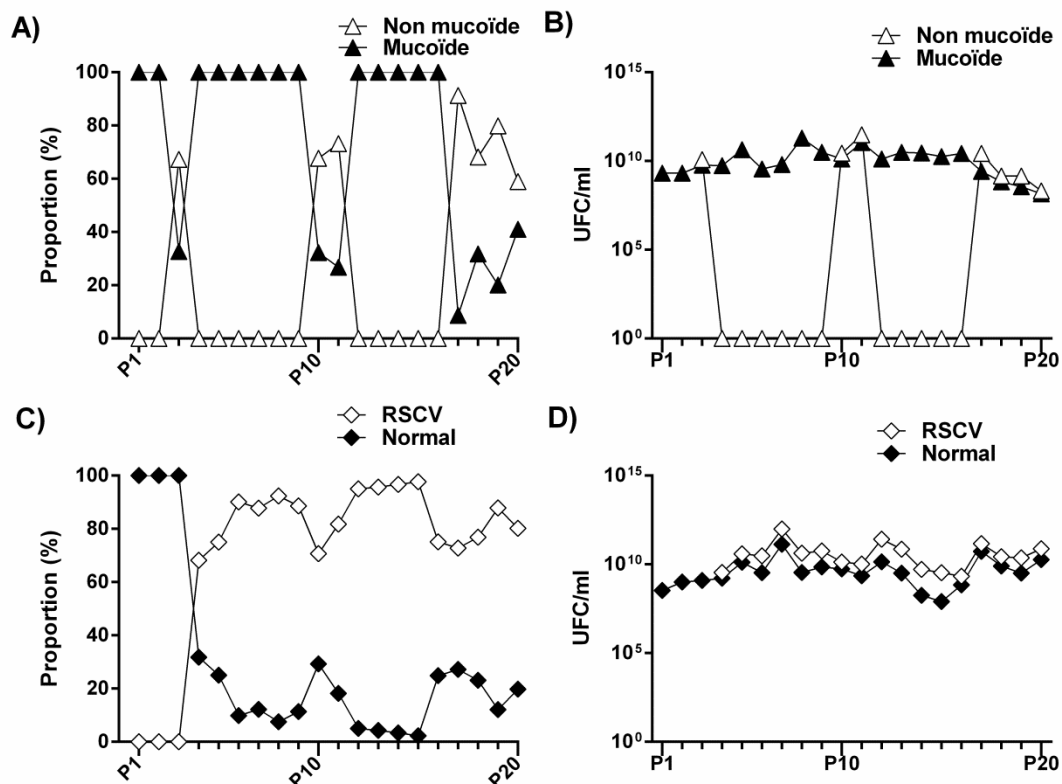


Figure 3.2 Détection des phénotypes. Quantification des phénotypes de croissance mucoïde (●) et non mucoïde (○) observés chez *P. aeruginosa* au cours des passages du suivi #1 sous forme de **A)** proportion (%) et **B)** UFC/ml. Évaluation de la présence des sous-populations de morphotype normal (◆) et du morphotype

RSCV (◇) de *P. aeruginosa* à chacun des passages lors du suivi #2 de biofilm mixte sous forme de **C**) proportion (%) et **D**) UFC/ml.

3.4 Caractérisation de virulence des isolats séquentiels de *P. aeruginosa*

Dans le but d'approfondir la description des isolats séquentiels, dont ceux présentant différents phénotypes, nous avons caractérisé l'expression de certains facteurs de virulence par des clones de chaque espèce issus du biofilm mixte. Nous avons également observé l'effet de surnageant de culture d'isolats séquentiels de *P. aeruginosa* sur le biofilm de *S. aureus* CF07L, tel que décrit au chapitre 2. Pour *S. aureus* nous avons comparé la production de biofilm, la sécrétion de protéases, l'hydrolyse de l'ADN (DNase) ainsi que la capacité d'hémolyse de différents clones séquentiels avec la souche initiale (CF07L). Aucune différence notable n'a été détectée en ce qui concerne la sécrétion de DNases, protéases ou d'hémolysines, tant en regardant la production par les clones de biofilm en mono-culture, co-culture et de la souche initiale (résultats non montrés). D'une manière semblable, l'expression de différents facteurs de virulence associés à *P. aeruginosa* ont fait l'objet d'analyses. La libération de congo-Red par l'hydrolyse de l'élastine sur une molécule commerciale élastine-congoRed a été mesurée par densité optique à 495nm afin de caractériser la production d'élastases par les différents isolats. L'activité élastolytique des surnageant de culture de PA14 et du mutant isogénique *lasR/rhlR* ont servi de témoin positif et négatif, respectivement. Des différences importantes ont été soulevées dans l'analyse des résultats observés. Les isolats de différents phénotypes isolés du suivi #1 ont présenté beaucoup de variation dans leur production d'élastase. Les isolats «mucoïdes» ainsi que les «non-mucoïdes» de certains passages ont démontré des résultats significativement supérieurs à ceux de la souche initiale PA14 alors que ceux provenant d'autres passages ont démontré des productions significativement inférieures (résultats non montrés). Il est

intéressant de noter que les résultats obtenus pour chacun des passages et chacun des phénotypes ont été hautement reproductibles. Il est également important de rapporter que le suivi effectué en mono-culture de *P. aeruginosa* a également procurer des clones séquentiels dont les productions d'élastases sont significativement différentes de celle mesurée avec la souche initiale PA14, soit en infériorité ou en supériorité, même si les phénotypes sont apparentés. Pour ce qui est du deuxième suivi en co-culture, de façon générale, il a été observé que le phénotype RSCV produit des niveaux inférieurs d'élastases que PA14. Par ailleurs, les isolats présentant un aspect typique sont, d'ordre général, de plus forts ou semblables producteurs d'élastases (résultats non montrés). Dans le cas échéant, les résultats ne suggèrent pas que la présence de *S. aureus* a nécessairement jouer un rôle dans la modulation d'expression d'élastases.

Un caractère important, décelé rapidement, est la capacité à former du biofilm par les différents morphotypes de *P. aeruginosa*. En croissance liquide, les cultures comprenant un phénotype RSCV dans leur composition démontraient des dépôts plus importants sur les parois de récipients, correspondants au biofilm bactérien. Pour définir de façon spécifique la formation de biofilm des différents morphotypes de croissance, on a procédé à la coloration du biofilm au violet de cristal pour chacun des phénotypes décelés au 20^e passage de croissance. Dans le cadre du suivi de biofilm mixte #1, le phénotype de croissance arborant un aspect plus mucoïde produit significativement plus de biofilm que la condition contrôle (PA14 après 20 passages de mono-culture) et le phénotype «non mucoïde» (Fig 3.3 A). Tel qu'attendu, ce dernier morphotype produit un biofilm semblable à celui produit par l'isolat de mono-culture. Par ailleurs, les résultats observés en comparant le biofilm produit par les différents isolats issus du suivi #2 présentent des patrons de biofilm distincts de la condition contrôle. Premièrement et de façon surprenante, la sous-population de *P. aeruginosa* associé au phénotype de croissance typique, mais provenant de la co-culture, présente une capacité de formation du biofilm inférieure à celle du *P.*

aeruginosa isolé de la mono-culture (Fig 3.3 B). D'une autre part, la population RSCV, ayant subi 20 passages de co-culture avec *S. aureus*, produit significativement plus de biofilm que l'isolat contrôle (Fig 3.3 B). Il sera intéressant d'investiguer ces traits spécifiques, car ceci pourrait expliquer, en partie du moins, le rôle qu'a joué chacun des phénotypes de *P. aeruginosa*, dans la co-existence des deux morphotypes ensemble, mais également avec *S. aureus*.

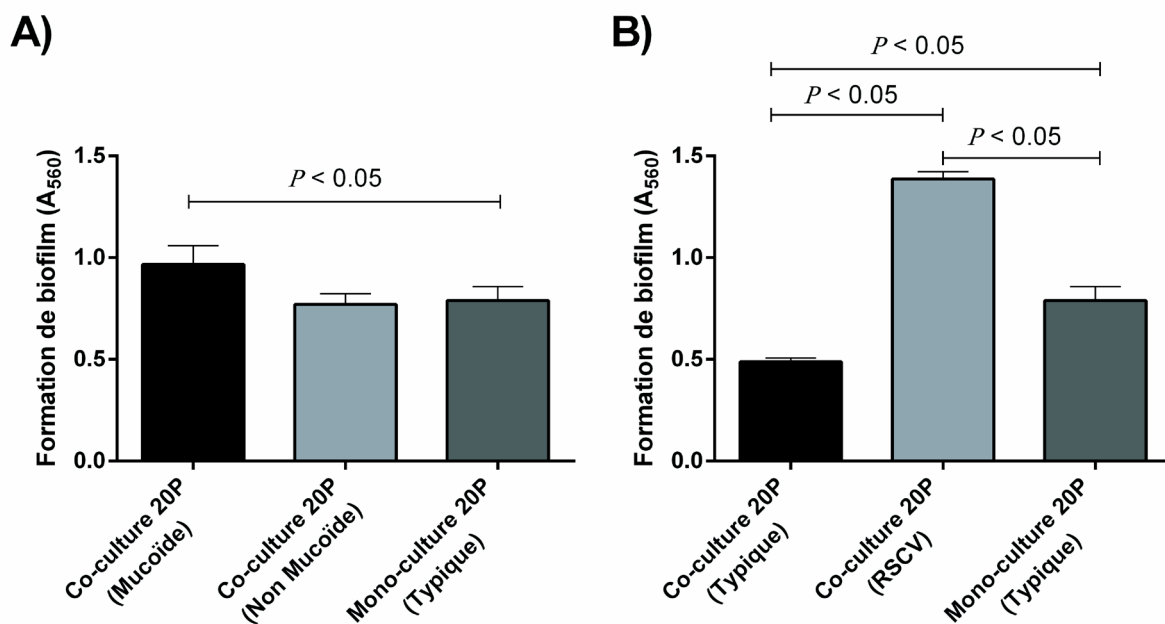


Figure 3.3 : Production de biofilm par *P. aeruginosa* PA14 après 20 passages séquentiels en mono-culture et par différents morphotypes distincts obtenus de co-culture avec *S. aureus* après 20 passages du suivi #1 (A) et du suivi #2 (B). Les résultats ont été analysés par ANOVA suivi du test de Tukey.

En connaissant les différentes réponses possibles de *S. aureus* au surnageant de *P. aeruginosa*, au niveau de la production de biofilm, différentes paires de *P. aeruginosa* et *S. aureus* provenant du biofilm *In vitro* ont été utilisées pour performer des essais de stimulation de biofilm. Aucun changement n'a été retrouvé en ce qui concerne la capacité du surnageant de *P. aeruginosa* à influencer le biofilm de *S.*

aureus, ni dans la situation inverse où on observe des changements dans la réponse de *S. aureus* au surnageant de *P. aeruginosa*. les paires d'isolats testées combinaient les clones de la co-existence entre eux et avec les souches contrôles (initiales). Des comparaisons ont également été faite avec la paire de souches initiales (PA14/CF07L). Des tests ont également été conduits afin de doser la pyocyanine ainsi que pour caractériser la mobilité des différents isolats obtenus par les différentes conditions de biofilm séquentiel testées. Aucun résultat notable n'a été soulevé par ces analyses.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La présente étude a été conduite afin d'approfondir les connaissances en ce qui concerne l'importance des interactions polymicrobiennes dans l'établissement d'infections chroniques respiratoires en fibrose kystique. Il devient de plus en plus apparent que les espèces bactériennes constituant le microbiome pulmonaire associé à la fibrose kystique puissent interagir ensemble ou s'adapter à une présence commune dans le processus de cohabitation de même que dans la progression d'infections (Sibley 2009; Sibley 2011; Hauser 2011). L'analyse du microbiome FK dans son ensemble est un travail de très longue durée et fastidieux puisque de récentes évidences démontrent que la santé respiratoire du patient et le niveau de richesse de la diversité microbienne semblent positivement corrélés (Twomey 2013; Conrad 2013). Il va sans dire que la physiologie du patient varie également d'un individu à l'autre, ayant possiblement des effets également sur la composition de la flore bactérienne pulmonaire (Lim 2013). L'analyse à plus petite échelle, en regardant de plus petites combinaisons d'espèces, peut procurer d'importants indices sur l'établissement d'infections polymicrobiennes. Dans cet ordre d'idées, de nombreuses études récentes en fibrose kystique s'intéressent à la recherche d'interactions interspécifiques entre différentes espèces d'importance (Zemanick 2011; Peters 2012; Klepac-Ceraj 2010; Jones 2004; Huang 2011; Filkins 2012; Bragonzi 2012). Dans le cas échéant, les deux pathogènes les plus prévalents dans les infections respiratoires en FK, soit *S. aureus* et *P. aeruginosa*, ont été étudiés dans le but de possiblement mieux comprendre la grande persistance de ces deux espèces dans

leur contexte. Tous les deux ont hautement été caractérisés pour leur régulation sophistiquée. Chaque espèce possède un système bien connu de communication cellulaire qui leur permet de réguler de façon adéquate leur croissance et l'expression de nombreux facteurs de virulence. Sur une base individuelle, on associe grandement les phases d'exacerbations des patients à la présence de *P. aeruginosa* tandis qu'on reconnaît *S. aureus* par sa difficulté d'éradication, expliquée par une grande capacité à se dissimuler et évader les défenses de l'hôte. Tous deux possèdent également une grande plasticité génomique, permettant l'acquisition aisée de modifications génétiques, contribuant à augmenter leur adaptabilité (Prunier 2003; Oliver 2000; Hogardt 2007; Driffield 2008; Ciofu 2010; Besier 2008). Cette dernière caractéristique explique pourquoi de nombreux génotypes, et donc de phénotypes, de *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont été retrouvés dans l'environnement pulmonaire associé à la FK. Ces éléments concordent également avec les résultats de cette étude.

Table 4.1 : Caractéristiques des isolats cliniques de *P. aeruginosa* et PA14

<i>P. aeruginosa</i> (isolat)	Coexistence (<i>S. aureus</i>)	Augmentation du biofilm de <i>S. aureus</i> CF1AL (A_{560})	C4-HSL (μ M)	3-oxo-C12- HSL (μ M)	HHQ (μ M)	PQS (μ M)	HQNO (μ M)	Rhamnolipides (mg/L)	Pyocyanine (% de PA14)
PA14	N/A	2,35	0,15	0,00	2,23	27,54	2,07	34,44	100,00
PAC5A	Oui	1,00	0,09	0,01	55,56	16,63	0,57	0,91	59,90
PAC5B	Oui	0,36	0,02	0,00	7,09	0,50	0,71	0,35	40,25
PAC6A	Oui	1,50	0,06	0,01	19,52	17,62	8,99	3,37	41,53
PAC6B	Oui	2,28	0,20	0,00	3,74	33,55	11,44	60,03	46,47
PAC9A	Oui	-0,03	0,21	0,00	0,04	0,63	0,08	1,72	42,03
PAC10A	Oui	-0,19	0,00	0,00	0,09	0,51	0,04	0,16	47,59
PAC10B	Oui	0,29	0,01	0,00	0,13	0,56	0,08	1,02	41,91
PAC11A	Non	2,48	0,38	0,32	6,88	25,68	12,98	17,30	42,31
PAC13A	Non	0,21	0,00	0,00	10,02	0,42	0,27	0,26	43,08
PAC13B	Non	0,39	0,00	0,00	4,05	0,24	1,06	0,42	41,31
PAC13C	Non	0,30	0,00	0,00	14,88	0,47	2,52	0,43	39,51
PAC14A	Non	2,38	0,09	0,00	27,86	15,35	5,85	0,42	57,66
PAC14B	Non	2,04	0,06	0,00	26,51	16,23	5,02	1,64	43,68
PAC15A	Non	1,45	0,18	0,00	26,23	16,81	4,58	0,42	37,47
PAC15B	Non	1,61	0,17	0,00	33,98	20,48	4,89	0,95	56,07
PAC17A	Non	0,20	0,00	0,00	0,21	0,47	0,04	0,70	31,70
PAC18A	Oui	0,04	0,00	0,00	0,08	0,47	0,03	0,38	71,27
PAC18B	Oui	0,33	0,00	0,00	0,14	0,54	0,06	0,24	38,17
PAC22A	Oui	1,74	0,32	0,01	72,13	7,04	2,88	30,23	56,41
PAC26A	Non	2,70	0,12	0,00	37,07	45,41	20,14	22,96	33,99
PAC31A	Non	1,27	0,04	0,09	48,13	4,16	1,40	4,36	55,20
PAC31B	Non	0,57	0,00	0,05	50,27	2,81	1,18	0,15	35,60
PAC32A	Non	1,37	0,08	0,00	32,74	13,91	5,39	0,26	61,53
PAC33A	Oui	0,18	0,00	0,00	0,08	0,24	0,04	0,86	41,12
PAC33B	Oui	0,43	0,00	0,00	0,08	0,48	0,04	0,49	40,62
PAC38A	Non	0,45	0,00	0,00	3,17	1,22	0,67	2,49	37,90
PAC38B	Non	0,08	0,00	0,00	3,20	0,44	0,38	0,30	38,30
PAC39A	Oui	2,12	0,22	0,00	3,01	30,38	11,82	67,76	70,60
PAC42A	Non	0,16	0,00	0,00	1,62	0,66	0,06	0,45	40,97
PAC44A	Non	0,95	0,21	0,00	48,32	2,04	1,21	0,64	50,93
PAC44B	Non	1,80	0,45	0,00	92,49	6,89	0,18	16,68	75,37
PAC44C	Non	0,28	0,24	0,00	48,46	1,42	0,44	1,01	51,98
PAC44D	Non	0,20	0,20	0,00	42,70	1,17	0,34	1,29	35,87
PAC46A	Non	0,27	0,00	0,00	1,73	0,91	0,42	0,64	39,02
PAC54A	Oui	0,19	0,00	0,00	0,25	0,50	0,09	0,54	40,48
PAC56A	Non	0,17	0,00	0,00	0,09	0,65	0,01	0,69	39,58
PAC56B	Non	0,14	0,00	0,00	0,01	0,20	0,00	0,31	43,07
PAC60A	Non	2,40	0,17	0,00	32,29	26,90	2,99	43,76	61,26
PAC61A	Oui	0,11	0,00	0,00	1,30	0,36	0,15	1,32	39,41
PAC70B	Non	0,46	0,00	0,06	50,69	2,19	2,68	0,42	37,54
PAC74A	Non	2,53	0,26	0,00	0,96	29,38	12,57	95,85	50,42
PAC76A	Non	0,77	0,09	0,00	54,12	3,79	0,73	0,67	55,80
PAC78A	Oui	0,46	0,09	0,00	37,97	1,04	1,07	0,38	39,28
PAC78B	Oui	0,10	0,00	0,00	0,10	0,83	0,13	2,53	35,80
PAC79A	Non	0,94	0,13	0,01	14,65	5,67	1,02	4,74	47,54
PAC79B	Non	0,43	0,00	0,00	3,81	0,66	0,17	1,20	40,16
PAC81A	Oui	-0,07	0,00	0,00	0,11	0,43	0,00	0,39	34,60
PAC81B	Oui	0,35	0,00	0,01	0,17	0,61	0,03	0,20	37,17
PAC84A	Oui	2,01	0,33	0,01	96,95	6,77	1,65	11,89	41,74
PAC91A	Oui	0,09	0,00	0,00	0,03	0,89	0,04	0,32	35,74
PAC93A	Non	0,71	0,06	0,00	8,96	6,71	5,45	0,50	37,83
PAC93B	Non	1,04	0,06	0,00	6,83	7,90	3,52	0,18	43,65
PAC93C	Non	0,79	0,03	0,00	6,52	9,12	5,23	0,32	48,26
PAC94A	Non	1,04	0,11	0,00	47,58	3,58	1,20	0,65	45,57
PAC95A	Non	0,20	0,00	0,00	0,85	0,38	0,02	0,59	42,17
PAC97A	Non	2,09	0,04	0,00	10,53	24,00	13,38	2,53	35,02
PAC106A	Non	0,28	0,11	0,01	6,98	0,74	0,40	1,19	53,16
PAC107A	Oui	0,13	0,00	0,00	0,05	0,56	0,03	0,24	36,62
PAC108A	Non	1,65	0,13	0,03	51,54	3,64	0,52	1,75	42,17
PAC112A	Oui	1,93	0,15	0,00	13,93	35,05	7,23	11,12	65,22
PAC31574	ND	0,48	0,04	0,00	4,96	2,38	3,62	1,36	107,55
PAC31687	ND	2,29	0,05	0,00	13,41	18,51	3,85	9,17	62,86
41113c	ND	1,63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45,61

Une banque d'isolats cliniques comprenant des souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus* parfois isolés de patients communs a été caractérisée afin de détecter de possibles interactions spécifiques entre les deux espèces. On savait déjà que le biofilm de *S. aureus* peut être augmenté en présence de HQNO de *P. aeruginosa* *In vitro* lors d'expériences avec des souches de référence (Mitchell 2010b). Avec l'objectif de voir si des phénomènes semblables étaient possibles par l'usage de souches cliniques, la capacité de tous les isolats cliniques de *P. aeruginosa*, isolés d'une cohorte de 31 patients à stimuler le biofilm de *S. aureus* a été évaluée avec une souche clinique préalablement caractérisée de *S. aureus*. L'analyse simultanée de la production de molécules signale et de virulence par les différentes souches de *P. aeruginosa* a permis de définir multiples situations possibles quant à ce qui pourrait être observé *In vivo* (Table 4.1). L'étude des exoproduits a confirmé l'effet antagoniste connu de différentes molécules de *P. aeruginosa* sur la croissance planctonique de *S. aureus*, mais également qu'une grande production d'exoproduits pouvait aussi être liée à une stimulation du biofilm (Fig 4.1) (Machan 1992; Jayaseelan 2013). Nos résultats ont confirmé qu'une grande hétérogénéité existait parmi les souches de *P. aeruginosa* retrouvée en FK. Avec le tiers des souches capables de stimuler de façon significative le biofilm d'une seule souche de *S. aureus*, les résultats permettent de proposer l'hypothèse que les deux tiers restants ont perdu cette capacité. Ces observations vont de pair avec celles décrites par d'autres groupes de recherche, notamment, en lien avec la forte émergence de mutants *lasR* associée au caractère chronique de certaines infections à *P. aeruginosa* dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique (Hogardt 2007; Hoffman 2009; Heurlier 2005). Le travail de cette étude a également porté sur l'adaptation réciproque des deux espèces et constitue une des premières preuves de ce qu'on pourrait qualifier de résilience, potentiellement due à une coexistence dans le poumon du patient, de la virulence des deux importants pathogènes (Zhao 2012; Stressmann 2012). L'étude des co-isolats, ces souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus* issues de patients communs, a permis de démontrer l'évidence que le phénomène observé est interspécifique puisque deux composantes sont requises : la

production d'un stimulus par *P. aeruginosa* et une réponse non altérée de *S. aureus*. Un modèle *In vitro* a été développé pour tenter de mettre en relief les effets d'une coexistence de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. De nouvelles analyses pourraient permettre de soutenir, de façon indéniable, que la coexistence avec *S. aureus* est la cause principale de l'émergence de phénotypes distincts tel que discuté au chapitre 3. Cependant, les phénotypes atypiques observés l'ont été seulement dans les conditions qui réunissaient les deux bactéries ensemble. De plus, le phénotype qu'on a qualifié de RSCV semble correspondre à la description faite par d'autres groupes d'un morphotype semblable retrouvé dans les voies respiratoires de patients atteints de FK. Tout comme dans cette étude, ce phénotype a été associé à une forte production de biofilm et considéré pertinent dans l'établissement chronique (Starkey 2009). Dans leur ensemble, les résultats de cette étude placent en première instance, l'étude des interactions microbiennes dans un environnement qui est favorable à leur mise en place, soit les voies respiratoires de patients atteints de fibrose kystique. Les résultats suggèrent également que l'apparition de sous-populations microbiennes peut se faire rapidement et potentiellement en réponse à une autre espèce bactérienne retrouvée dans le mucus pulmonaire.

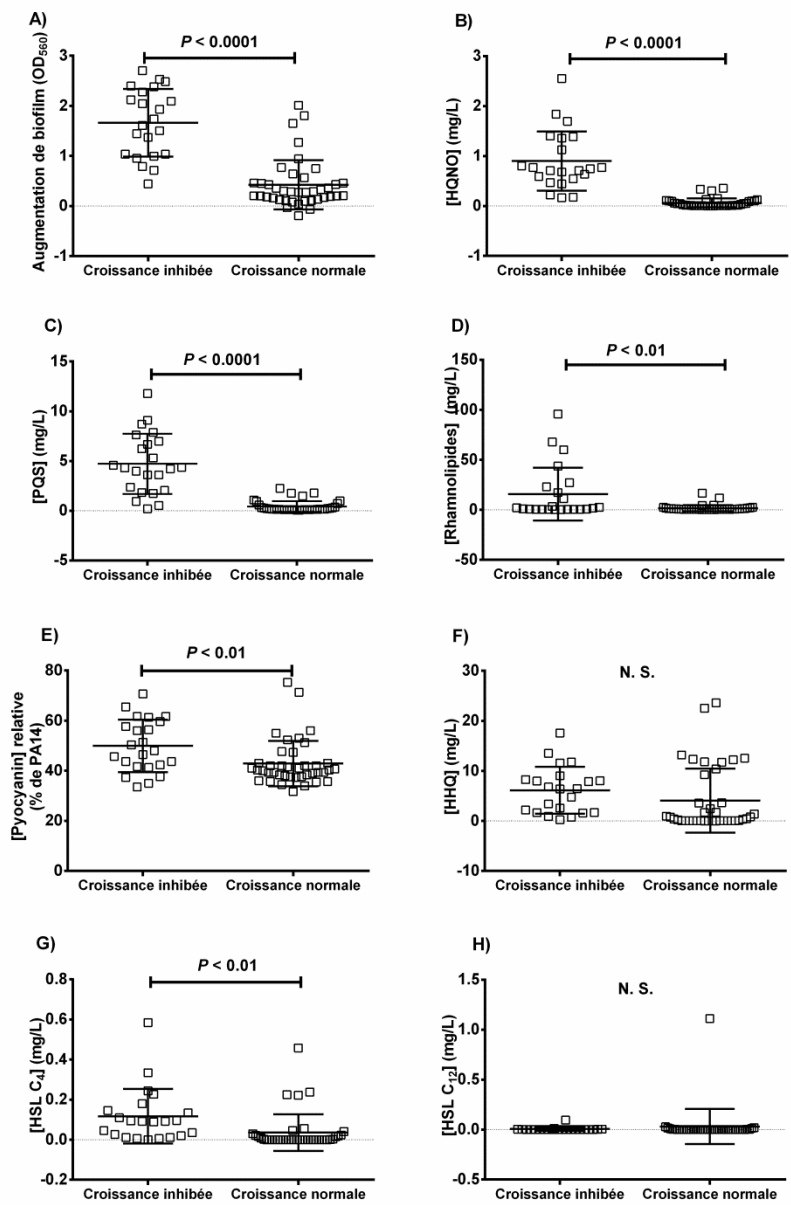


Figure 4.1 Distribution des isolats de *P. aeruginosa* selon leur inhibition de la croissance de *S. aureus* CF07L selon (A) la capacité de stimulation du biofilm (B) la production de HQNO (C) de PQS (D) rhamnolipides (E) pyocyanine (F) HHQ ainsi que (G) C4-HSL et (H) C12-HSL

CHAPITRE 5

CONCLUSION

L'étude des interactions polymicrobiennes dans l'établissement d'infections est importante dans la compréhension du déroulement des infections bactériennes associées à la fibrose kystique ainsi que dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les résultats de séquençage génomique d'isolats cliniques utilisés dans le cadre de cette étude permettront potentiellement de trouver de nouveaux indices au niveau de la mécanistique englobant les adaptations de *S. aureus* à *P. aeruginosa* et vice-versa. Des études comme celle présentée ici mettent en lumière les relations possibles entre individus d'espèces différentes au niveau microbien. Bien qu'on s'y intéresse de plus en plus dans le contexte associé à la fibrose kystique, il ne serait pas surprenant que cette réalité existe dans de multiples autres contextes et environnements.

Bibliographie

Alexis, N.E., Muhlebach, M.S., Peden, D.B. and Noah, T.L. (2006). Attenuation of host defense function of lung phagocytes in young cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 5 17-25

Beck, J.M., Young, V.B. and Huffnagle, G.B. (2012). The microbiome of the lung. *Transl Res*

Begun, J., Gaiani, J.M., Rohde, H., Mack, D., Calderwood, S.B., Ausubel, F.M. and Sifri, C.D. (2007). Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* 3 e57

Besier, S., Smaczny, C., von Mallinckrodt, C., Krahl, A., Ackermann, H., Brade, V. and Wichelhaus, T.A. (2007). Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 45 168-172

Besier, S., Zander, J., Kahl, B.C., Kraiczy, P., Brade, V. and Wichelhaus, T.A. (2008). The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 52 2183-2189

Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R. and Gotz, F. (2009). Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75 6910-6912

Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* 1-51

Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M. and Hoiby, N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 44 547-558

Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Hoiby, N. and Ciofu, O. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 5 e10115

Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K. (2004). Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101* 16630-16635

Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lore, N.I., Bianconi, I., Dalmastri, C., Ryan, R.P. and Bevivino, A. (2012). Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLoS One* *7* e52330

Brennan, S. (2008). Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* *9* 271-279; quiz 279-280

Callaghan, M. and McClean, S. (2012). Bacterial host interactions in cystic fibrosis. *Curr Opin Microbiol* *15* 71-77

Cataldi, M., Sblendorio, V., Leo, A. and Piazza, O. (2013). Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? *Pulm Pharmacol Ther*

Charlson, E.S., Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F.D. and Collman, R.G. (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* *184* 957-963

Ciofu, O., Mandsberg, L.F., Bjarnsholt, T., Wassermann, T. and Hoiby, N. (2010). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology* *156* 1108-1119

Ciofu, O., Mandsberg, L.F., Wang, H. and Hoiby, N. (2012). Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* *65* 215-225

Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E. and Hoiby, N. (2005). Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* *49* 2276-2282

Conrad, D., Haynes, M., Salamon, P., Rainey, P.B., Youle, M. and Rohwer, F. (2013). Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am J Respir Cell Mol Biol* *48* 150-156

Cox, M.J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M.S., Huang, Y.J., Daly, R.A., Karaoz, U., Andersen, G.L., Brown, R., Fujimura, K.E., *et al.* (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* 5 e11044

Damron, F.H. and Yu, H.D. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity. *J Bacteriol* 193 286-291

de Vrankrijker, A.M., Wolfs, T.F. and van der Ent, C.K. (2010). Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 11 246-254

Delhaes, L., Monchy, S., Frealle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., Prevotat, A., Wallet, F., Wallaert, B., Dei-Cas, E., *et al.* (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One* 7 e36313

Deligianni, E., Pattison, S., Berrar, D., Ternan, N.G., Haylock, R.W., Moore, J.E., Elborn, S.J. and Dooley, J.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *BMC Microbiol* 10 38

Deschaght, P., Schelstraete, P., Van Simaey, L., Vanderkercken, M., Raman, A., Mahieu, L., Van Daele, S., De Baets, F. and Vaneechoutte, M. (2013). Is the Improvement of CF Patients, Hospitalized for Pulmonary Exacerbation, Correlated to a Decrease in Bacterial Load? *PLoS One* 8 e79010

Dodge, J.A., Lewis, P.A., Stanton, M. and Wilsher, J. (2007). Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 29 522-526

Doring, G., Flume, P., Heijerman, H. and Elborn, J.S. (2012). Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros* 11 461-479

Doud, M., Zeng, E., Schneper, L., Narasimhan, G. and Mathee, K. (2009). Approaches to analyse dynamic microbial communities such as those seen in cystic fibrosis lung. *Hum Genomics* 3 246-256

Doud, M.S., Light, M., Gonzalez, G., Narasimhan, G. and Mathee, K. (2010). Combination of 16S rRNA variable regions provides a detailed analysis of bacterial community dynamics in the lungs of cystic fibrosis patients. *Hum Genomics* 4 147-169

Driffield, K., Miller, K., Bostock, J.M., O'Neill, A.J. and Chopra, I. (2008). Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 61 1053-1056

Dubern, J.F. and Diggle, S.P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* 4 882-888

Erb-Downward, J.R., Thompson, D.L., Han, M.K., Freeman, C.M., McCloskey, L., Schmidt, L.A., Young, V.B., Toews, G.B., Curtis, J.L., Sundaram, B., *et al.* (2011). Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One* 6 e16384

Filkins, L.M., Hampton, T.H., Gifford, A.H., Gross, M.J., Hogan, D.A., Sogin, M.L., Morrison, H.G., Paster, B.J. and O'Toole, G.A. (2012). Prevalence of streptococci and increased polymicrobial diversity associated with cystic fibrosis patient stability. *J Bacteriol* 194 4709-4717

Flanagan, J.L., Brodie, E.L., Weng, L., Lynch, S.V., Garcia, O., Brown, R., Hugenholtz, P., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Wiener-Kronish, J.P., *et al.* (2007). Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 45 1954-1962

Gibson, R.L., Burns, J.L. and Ramsey, B.W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168 918-951

Gil, C., Solano, C., Burgui, S., Latasa, C., Garcia, B., Toledo-Arana, A., Lasa, I. and Valle, J. (2013). Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun*

Goerke, C. and Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300 520-525

Guss, A.M., Roeselers, G., Newton, I.L., Young, C.R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S. and Cavanaugh, C.M. (2011). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J* 5 20-29

Hasset, D.J., Korfhagen, T.R., Irvin, R.T., Schurr, M.J., Sauer, K., Lau, G.W., Sutton, M.D., Yu, H. and Hoiby, N. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opin Ther Targets* 14 117-130

Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M. and McColley, S.A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24 29-70

Heijerman, H. (2005). Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J Cyst Fibros* 4 *Suppl* 2 3-5

Heurlier, K., Denervaud, V., Haenni, M., Guy, L., Krishnapillai, V. and Haas, D. (2005). Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol* 187 4875-4883

Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., *et al.* (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5 e8578

Hoffman, L.R., Deziel, E., D'Argenio, D.A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W. and Miller, S.I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 19890-19895

Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Emerson, J., Houston, L.S., Burns, J.L., Ramsey, B.W. and Miller, S.I. (2009). *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* 8 66-70

Hoffman, L.R. and Ramsey, B.W. (2013). Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest* 143 207-213

Hogardt, M., Hoboth, C., Schmoldt, S., Henke, C., Bader, L. and Heesemann, J. (2007). Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 195 70-80

Holby, N. (1977a). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relative prevalence of antibodies in serum against cathodic and anodic migrating *P. aeruginosa* antigens determined by immunoelectrophoretic methods. *Acta Pathol Microbiol Scand C* 85 149-152

Holby, N. and Olling, S. (1977b). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Bactericidal effect of serum from normal individuals and patients with cystic fibrosis on *P. aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis or other diseases. *Acta Pathol Microbiol Scand C* 85 107-114

Huang, Y.J., Nelson, C.E., Brodie, E.L., Desantis, T.Z., Baek, M.S., Liu, J., Woyke, T., Allgaier, M., Bristow, J., Wiener-Kronish, J.P., *et al.* (2011). Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 127 372-381 e371-373

Hunter, R.C., Klepac-Ceraj, V., Lorenzi, M.M., Grotzinger, H., Martin, T.R. and Newman, D.K. (2012). Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47 738-745

Jayaseelan, S., Ramaswamy, D. and Dharmaraj, S. (2013). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*

Jewes, L.A. and Spencer, R.C. (1990). The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 31 271-274

Jones, A.M., Dodd, M.E., Govan, J.R., Barcus, V., Doherty, C.J., Morris, J. and Webb, A.K. (2004). *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 59 948-951

Klepac-Ceraj, V., Lemon, K.P., Martin, T.R., Allgaier, M., Kembel, S.W., Knapp, A.A., Lory, S., Brodie, E.L., Lynch, S.V., Bohannon, B.J., *et al.* (2010). Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 12 1293-1303

Knowles, M.R. and Boucher, R.C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109 571-577

Kobayashi, H., Kobayashi, O. and Kawai, S. (2009). Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *J Infect Chemother* 15 125-142

Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D. and Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 13 47-58

Lim, Y.W., Evangelista, J.S., 3rd, Schmieder, R., Bailey, B., Haynes, M., Furlan, M., Maughan, H., Edwards, R., Rohwer, F. and Conrad, D. (2013). Clinical Insights from Metagenomic Analysis of Cystic Fibrosis Sputum. *J Clin Microbiol*

Lipuma, J.J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23 299-323

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

Lynch, S.V. and Bruce, K.D. (2013). The cystic fibrosis airway microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3

Machan, Z.A., Taylor, G.W., Pitt, T.L., Cole, P.J. and Wilson, R. (1992). 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 30 615-623

Mashburn, L.M., Jett, A.M., Akins, D.R. and Whiteley, M. (2005). *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J Bacteriol* 187 554-566

McCloskey, M., McCaughan, J., Redmond, A.O. and Elborn, J.S. (2001). Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Ir J Med Sci* 170 28-31

Mitchell, G., Brouillette, E., Seguin, D.L., Asselin, A.E., Jacob, C.L. and Malouin, F. (2010a). A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog* 48 18-27

Mitchell, G., Fugere, A., Pepin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E.H., Cantin, A.M. and Malouin, F. (2013). SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS One* 8 e65018

Mitchell, G., Grondin, G., Bilodeau, G., Cantin, A.M. and Malouin, F. (2011). Infection of polarized airway epithelial cells by normal and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF-kappaB. *Infect Immun* 79 3541-3551

Mitchell, G., Seguin, D.L., Asselin, A.E., Deziel, E., Cantin, A.M., Frost, E.H., Michaud, S. and Malouin, F. (2010b). *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* 10 33

Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C.L., Langlois-Begin, P., Michaud, S. and Malouin, F. (2006). Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J Bacteriol* 188 64-76

Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J.L., Wright, E.A., Ledson, M.J., Walshaw, M.J., Brockhurst, M.A. and Winstanley, C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med* 183 1674-1679

Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S. and Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 313 96-102

Nguyen, D. and Singh, P.K. (2006). Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 8305-8306

Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. and Blazquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288 1251-1254

Peleg, A.Y., Hogan, D.A. and Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 8 340-349

Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., O'May, G.A., Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev* 25 193-213

Pihl, M., Chavez de Paz, L.E., Schmidtchen, A., Svensater, G. and Davies, J.R. (2010). Effects of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59 504-512

Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. and Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4 295-305

Prunier, A.L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J.F. and Leclercq, R. (2003). High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from

patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 187 1709-1716

Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O'Shea, P., Chhabra, S.R., Camara, M. and Williams, P. (2006). N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74 910-919

Reen, F.J., Mooij, M.J., Holcombe, L.J., McSweeney, C.M., McGlacken, G.P., Morrissey, J.P. and O'Gara, F. (2011). The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol Ecol* 77 413-428

Reid, D.W., Blizzard, C.L., Shugg, D.M., Flowers, C., Cash, C. and Greville, H.M. (2011). Changes in cystic fibrosis mortality in Australia, 1979-2005. *Med J Aust* 195 392-395

Reid, D.W., Latham, R., Lamont, I.L., Camara, M. and Roddam, L.F. (2013). Molecular analysis of changes in *Pseudomonas aeruginosa* load during treatment of a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. and Eberl, L. (2001a). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147 3249-3262

Riedel, K., Ohnesorg, T., Krogfelt, K.A., Hansen, T.S., Omori, K., Givskov, M. and Eberl, L. (2001b). N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 183 1805-1809

Roman, F., Canton, R., Perez-Vazquez, M., Baquero, F. and Campos, J. (2004). Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol* 42 1450-1459

Rudkjobing, V.B., Thomsen, T.R., Alhede, M., Kragh, K.N., Nielsen, P.H., Johansen, U.R., Givskov, M., Hoiby, N. and Bjarnsholt, T. (2012). The microorganisms in chronically infected end-stage and non-end-stage cystic fibrosis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 236-244

Scott, F.W. and Pitt, T.L. (2004). Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol* 53 609-615

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bachi, B. and Bischoff, M. (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* 76 2044-2050

Sibley, C.D., Parkins, M.D., Rabin, H.R., Duan, K., Norgaard, J.C. and Surette, M.G. (2008). A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 15070-15075

Sibley, C.D., Parkins, M.D., Rabin, H.R. and Surette, M.G. (2009). The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Investig Drugs* 10 787-794

Sibley, C.D. and Surette, M.G. (2011). The polymicrobial nature of airway infections in cystic fibrosis: Cangene Gold Medal Lecture. *Can J Microbiol* 57 69-77

Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., *et al.* (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 8487-8492

Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, M.J., Starner, T.D., *et al.* (2009). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191 3492-3503

Stressmann, F.A., Rogers, G.B., van der Gast, C.J., Marsh, P., Vermeer, L.S., Carroll, M.P., Hoffman, L., Daniels, T.W., Patel, N., Forbes, B., *et al.* (2012). Long-term cultivation-independent microbial diversity analysis demonstrates that bacterial communities infecting the adult cystic fibrosis lung show stability and resilience. *Thorax* 67 867-873

Sze, M.A., Dimitriu, P.A., Hayashi, S., Elliott, W.M., McDonough, J.E., Gosselink, J.V., Cooper, J., Sin, D.D., Mohn, W.W. and Hogg, J.C. (2012). The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 185 1073-1080

Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Volker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R.A., Becker, K., *et al.* (2011). Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3 129-141

Tunney, M.M., Field, T.R., Moriarty, T.F., Patrick, S., Doering, G., Muhlebach, M.S., Wolfgang, M.C., Boucher, R., Gilpin, D.F., McDowell, A., *et al.* (2008). Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177 995-1001

Tunney, M.M., Klem, E.R., Fodor, A.A., Gilpin, D.F., Moriarty, T.F., McGrath, S.J., Muhlebach, M.S., Boucher, R.C., Cardwell, C., Doering, G., *et al.* (2011). Use of culture and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 66 579-584

Twomey, K.B., Alston, M., An, S.Q., O'Connell, O.J., McCarthy, Y., Swarbreck, D., Febrer, M., Dow, J.M., Plant, B.J. and Ryan, R.P. (2013). Microbiota and Metabolite Profiling Reveal Specific Alterations in Bacterial Community Structure and Environment in the Cystic Fibrosis Airway during Exacerbation. *PLoS One* 8 e82432

Ulrich, M., Worlitzsch, D., Viglio, S., Siegmann, N., Iadarola, P., Shute, J.K., Geiser, M., Pier, G.B., Friedel, G., Barr, M.L., *et al.* (2010). Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9 217-227

van der Gast, C.J., Walker, A.W., Stressmann, F.A., Rogers, G.B., Scott, P., Daniels, T.W., Carroll, M.P., Parkhill, J. and Bruce, K.D. (2011). Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *ISME J* 5 780-791

Worlitzsch, D., Rintelen, C., Bohm, K., Wollschlager, B., Merkel, N., Borneff-Lipp, M. and Doring, G. (2009). Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 15 454-460

Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., *et al.* (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109 317-325

Yang, L., Liu, Y., Markussen, T., Hoiby, N., Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2011). Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62 339-347

Zemanick, E.T., Sagel, S.D. and Harris, J.K. (2011). The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Curr Opin Pediatr* 23 319-324

Zhao, J., Schloss, P.D., Kalikin, L.M., Carmody, L.A., Foster, B.K., Petrosino, J.F., Cavalcoli, J.D., VanDevanter, D.R., Murray, S., Li, J.Z., *et al.* (2012). Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 5809-5814

