

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Saad Dahleb, Blida  
Faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude  
En vue de l'obtention du diplôme de Master  
Domaine Science de la Nature et de la vie  
Filière : Biologie  
Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème :

**Etude génomique à grande échelle de la dynamique de  
l'évolution de la *Pseudomonas aeruginosa* dans un  
environnement hostile**

Présenté par:

ABDOUS Rym

Date de soutenance :

17/12/2012

Devant le jury :

Nom	Grade	Lieu	Qualité
Mme INALE. D	MAA	USDB	Présidente
Mr MOHAMED SAID R.	MAA	FSAVB	Promoteur
Mme HERKAT. S	MAA	USDB	Examinatrice
Mr BELHOCINE M.	Assistant	TAGC	Co-promoteur

Promotion : 2011/2012

## *Remerciements*

*En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur MOHAMED SAID, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges professionnelles. Je tiens à lui exprimé aussi toute ma reconnaissance d'avoir eu la gentillesse de lire et corriger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur BELHOCINE qui, en tant que CO-promoteur, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Je tiens à remercier également Madame INALE d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance, ainsi que Mme HERKAT d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à tous et à toutes.*

## *Dédicaces*

*Que Dieu le tout puissant soit loué de m' avoir permis  
d' atteindre les prémises du savoir après un long  
chemin, et couronné mon effort par la joie de l' arrivée  
dont je l' espère, ce travail en sera témoin.*

*Ainsi je le dédie :*

*A mes parents dont j' ai toujours voulu attiser la fierté*

*A mon mari le noyau de ma confiance*

*A mes amies le secret de mon bonheur*

*A tous ceux qui ont prié pour que je réussisse, ceux qui  
ont cru en moi, ceux qui m' ont aidé et supporté...*

*A tous ceux dont le nom ne figure pas mais que pourtant  
je n' oublie pas.*

# SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux

Liste des abréviations

## Introduction

<b>Revue de la littérature</b> .....	2
I. La bactérie.....	3
II. La fibrose kystique.....	4
➤ Manifestations cliniques.....	5
• Pulmonaires	
• Extra-pulmonaires	
➤ Traitement.....	5
➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et la fibrose kystique.....	6
III. L'adaptation de <i>P. aeruginosa</i> .....	7
1. La biosynthèse de l'alginate.....	7
2. La mutation du gène LasR	
3. Le système de sécrétion de type III (SST3).....	10
4. La résistance aux antibiotiques.....	12
➤ Les systèmes d'efflux.....	12
➤ La résistance aux B-lactamines.....	14
• Les B-lactamase	
○ La surproduction de la céphalosporinases AmpC	
○ Production d'autres B-lactamases	
• Les porines	
➤ La résistance aux aminosides.....	15
• Les aminosides	
• Les enzymes modificatrices des aminosides	
• La modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS)	
○ Le LPS	
○ La modification	
• La méthylation de l'ARN16S	
➤ La résistance à la colistine.....	18
➤ La résistance aux fluoroquinolones.....	19
5. La déficience du mismatch repair system.....	21

<b>Matériel et méthodes</b> .....	24
I. Matériel.....	25
I. 1 Les puces à ADN.....	25
I. 1. 1 Principe et types de puces à ADN.....	25
I. 1. 2. La fabrication des puces à ADN.....	28
a) La fabrication de la puce	
b) La fixation des sondes	
• Transfert de brins d'ADN	
• La synthèse in situ	
I. 1. 3. Préparation des échantillons, amplification, marquage et hybridation des cibles.....	29
a) La préparation des acides nucléiques	
b) Amplification et marquage	
c) L'hybridation et lavage	
I. 1. 4. La lecture ou acquisition des images.....	30
I. 1. 5. L'analyse des données.....	30
a) La localisation des spots	
b) La segmentation des spots	
c) L'extraction des indices	
d) La classification des données	
I. 1. 6. Exemples d'application des puces à ADN.....	32
I. 2. Le logiciel R.....	33
I. 3. MeV.....	33
I. 4 DAVID.....	34
II. Méthodes.....	35
II. 1. Objectif de l'étude.....	35
II. 2. Présentation des données.....	35
II. 3. Prétraitement et normalisation des données avec le logiciel R.....	37
II. 4. Clustering et identification des signatures spécifiques de l'activation et la répression.....	39
II. 5. Annotation fonctionnelle et définitions des voies de signalisations avec DAVID.....	42

<b>Résultats</b> .....	46
➤ Le logiciel R.....	47
➤ MultiExperiment Viewer.....	48
➤ DAVID.....	50

<b>Discussion</b> .....	51
-------------------------	----

<b>Conclusion-Perspectives</b> .....	57
--------------------------------------	----

## **Annexes**

- Annexe n°1 : le script de R
- Annexe n°2 : annexe des figures
- Annexe n°3 : les protocoles des kits d'analyse utilisés

## **Références**

## **Résumé**

## Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Comparaison de la clairance mucociliaire chez un sujet sain et chez un patient atteint de mucoviscidose.....	4
Figure 2 : Colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> non-mucoïdes (A) et mucoïdes (B).....	8
Figure 3 : Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
Figure 4 : Le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> avant et après un contact avec la cellule cible.....	11
Figure 5 : Représentation schématique des différentes familles de systèmes d'efflux actif chez les bactéries à Gram-.....	12
Figure 6 : Organisation structurale d'un système d'efflux actif triparti de la famille RND.....	13
Figure 7 : Structure générale des B-lactamines.....	14
Figure 8 : Structure des aminosides à noyau 2-désoxystréptamine.....	16
Figure 9 : Principales enzymes modificatrices des aminosides.....	17
Figure 10 ; Structure de la colistine (polymyxine E1).....	19
Figure 11 : Structure d'une fluoroquinolones (la ciprofloxacine).....	20
Figure 12 : Evolution de la virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	22
Figure 13 : La transition de <i>P. aeruginosa</i> de sa forme initiale infectieuse vers la forme chronique en phase terminale de la mucoviscidose.....	23
Figure 14 : Une puce peut contenir de quelques dizaines de rapporteurs (sondes) à plusieurs millions.....	26
Figure 15 : Principe générale des puces à ADN.....	32
Figure 16 : Représentation de la prise d'échantillon dans le temps.....	36
Figure 17 : Analyse d'acides nucléiques par puce à ADN.....	36
Figure 18 : Image d'une puce à ADN d'un échantillon pris en 2008 obtenue par la fonction image() de R.....	37
Figure 19 : Tableau des expressions génique obtenues par R.....	38

<i>Figure 20 : Interface du logiciel MultiExperiment Viewer.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 21 : Paramétrage du clustering sur MeV.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 22 : Première étape avec DAVID : chargement de la liste à analyser.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 23 : Deuxième étape de DAVID : le choix de l'outil d'analyse.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 24 : Voies de signalisation régulées à la baisse par DAVID.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 25 : Voies de signalisation régulées à la hausse par DAVID.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 26 : Boxplots des données brutes.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 27 : Boxplots des données après la normalisation RMA.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 28 : Boxplots des expressions relatives.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 29 : Clustering des 200 gènes sélectionnés par MeV.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 30 : Les deux types d'infections induites par P. aeruginosa.....</i>	<i>52</i>
<hr/>	
<i>Tableau 1 : Principaux substrats des systèmes d'efflux actifs de P. aeruginosa.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 2 : Principaux types de puces à ADN.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 3 : Les voies de signalisation différemment exprimées.....</i>	<i>50</i>



### ***Liste des abréviations***

**COPD** : **M**aladies **P**ulmonaires **O**bstructives **C**hroniques

**CFTR**: **C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **c**onductance **R**egulator

**CF**: **C**ystic **F**ibrosis

**FK** : **F**ibrose **K**ystique

**RhDNse** : **D**esoxyribo**N**ucléase **R**ecombinante **H**umaine

**ADN** : **A**cide **D**éoxyribo**N**ucléique

**ADNc** : **A**DN **C**omplémentaire

**ARN** : **A**cide **R**ibo**N**ucléique

**PMNs**: **P**oly**M**orpho**N**uclear leukocytes

**MRS**: **M**ismatch **R**epair **S**ystem

**QS**: **Q**orum **Q**ensing

**Acyl-HSL** : **A**cy**L**-**H**omoserines **L**actones

**SST3** : **S**ystème de **S**écrétion de **t**ype **3**

**ABC**: **A**TP **B**inding **C**asette

**MATE**: **M**ultidrug **A**nd **T**oxic compound **E**xtrusion

**MFS**: **M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily

**SMR**: **S**mall **M**ultidrug **R**esistance

**RND**: **R**esistance **N**odulation cell **D**ivision

**ATBs** : **A**ntibiotiques

**Mb int** : **M**embrane **i**nterne

**Mb ext** : **M**embrane **e**xterne

**PLP**: **P**rotéine **L**iant la **P**énicilline

**C1G** : **C**éphalosporinases de première **G**énération

**C2G** : Céphalosporinases de deuxième **G**énération

**LPS** : Lipo**P**oly**S**accharide

**CMI** : Concentration **M**inimale Inhibitrice

**PCR** : Polymerase **C**hain **R**eaction

**UTP** : Deoxy**U**ridine tri**P**hosphate

**OMS** : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

**ER**: Estrogen **R**eceptor

**TNF**: Tumor **N**ecrosis **F**actor

**IL**: Inter**L**eukine

**DAVID**: Database for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery

**TMeV**: The **M**ulti**E**xperiment **V**iewer.

## INTRODUCTION

Les infections bactériennes responsables de la pneumonie, des maladies diarrhéiques et de la tuberculose causent 9 millions de décès sur les 13 millions occasionnés par les maladies infectieuses. Ainsi, les infections bactériennes représentent 70 % des cas de mortalité causés par les microorganismes (Walsh 2003).

Selon le NIH (National Institute of Health aux USA), les maladies infectieuses représentent la seconde cause de décès et la première cause de perte d'années de vie productives à travers le monde (Fauci 2001). Ces données font des infections bactériennes, non seulement un problème de santé mais aussi un impact négatif sur le plan social et économique.

Une bonne compréhension de la dynamique de croissance des bactéries pathogènes au sein des hôtes infectés est une question fondamentale qui a une forte influence sur l'échelle biologique et médicale et ayant des conséquences importantes sur la façon dont les infections bactériennes sont comprises et entravées. Dans les cas d'infections bactériennes persistantes à vie, les dynamiques de croissance deviennent également un aspect important spécifiquement liés aux mécanismes d'adaptation des agents pathogènes et de leur évolution.

Dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, le mucus forme un gel fixe et épais adhérant au revêtement épithélial, ce qui affecte l'activité muco-ciliaire aboutissant à une déficience de la clairance des microbes inhalés.

Les Patients CF souffrent d'infections chroniques et récurrentes des voies respiratoires qui éventuellement conduisent à une insuffisance pulmonaire suivie de la mort. *Pseudomonas aeruginosa* est l'un des principaux agents pathogènes pour ces patients ainsi que la principale cause de mortalité et de morbidité. Au cours de la phase aiguë l'infection par PA est caractérisée par une diversité de souches dont les phénotypes sont similaires à ceux des isolats environnementaux. En revanche, en phase chronique, les souches souvent isolées sont des souches adaptées. Une fois adaptée, *P. aeruginosa* peut persister pendant plusieurs décennies dans les voies respiratoires, déjouer les mécanismes de défense de l'hôte et résister à l'antibiothérapie intensive ( Lei Yang et al 2011).

L'essor fulgurant des études de génomique fonctionnelle, faisant suite aux avancées des projets internationaux de séquençage des génomes amorcés à la fin des années 80, suscite aujourd'hui un très grand intérêt expérimental et conceptuel. Les séquences des génomes entiers de nombreux organismes sont désormais connues – plus de 100 bactéries, 1000 virus, et plusieurs eucaryotes modèles tels que les levures *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*, la drosophile *D. melanogaster*, l'arabidopsis *A. thaliana* et le nématode *C. elegans* – ainsi que de la majeure partie du génome humain publié en avril 2003 (Lander, E.S., et al.2001 ; Venter, J.C., et al.2001)

Le fait que le génome de PA a été également séquencé, l'étude de son transcriptome (e.g. microarray analysis et RNA-Seq) devient une approche convenable pour caractériser les différences biologiques à partir de différents isolats de PA dans la FC. L'étude du transcriptome permet de mesurer l'expression génique à grande échelle et ainsi livrer des informations capitales sur l'adaptation de *P. aeruginosa* adaptation durant l'infection. Cerner les mécanismes d'évolution de cette bactérie permet de mieux comprendre son adaptation et peut être de ce fait, neutraliser sa virulence et sa résistance ( Lei Yang et al 2011).

Le concept de puces à ADN repose sur une technologie multidisciplinaire intégrant la biologie, la nanotechnologie, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'images et la bio-informatique. Grâce à cet outil, il est possible de mesurer le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément.

L'analyse biologique des premières biopuces repose sur l'étude du transcriptome (étude des ARNs messagers) d'une cellule ou d'un organisme. Si de nouvelles applications pour les puces à ADN ont également été développées (biopuces pour le diagnostic, pour la génomique comparative, pour l'identification de région d'ADN régulatrices après immunoPrécipitation de la chromatine (ChIPchips)), seules les biopuces transcriptome sont effectivement utilisées pour ce travail

L'enjeu réside à présent dans la caractérisation de la fonction des gènes et des voies de régulation leur permettant de réaliser les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. Des outils bio-informatique et des stratégies innovants se sont développés afin de répondre aux besoins d'une exploration par des analyses fonctionnelles systématiques à l'échelle de la globalité du génome.

***REVUE DE LA LITTERATURE***

## **I. La bactérie :**

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, droit ou légèrement courbé, non sporulant à mobilité monotriche. Il mesure entre 1 à 5 µm de long par 0.5 à 1.0 µm de large. Il est chimiohétérotrophe, aérobie de préférence avec un métabolisme respiratoire exclusivement oxydatif utilisant l'O<sub>2</sub>, le nitrate peut être utilisé aussi en anaérobiose comme accepteur final (Prescot *et al.*, 1995). Le bacille est oxydase positive et catalase positive, il possède une grande panoplie nutritionnelle incluant une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone.

La bactérie est mésophile et donc à une température optimale de développement se situant entre 30 et 37°C, elle est cependant capable de se multiplier dans un large spectre de température allant de 4 à 45°C. *P. aeruginosa* est distinguable par la synthèse de pigments verts diffusable dans le milieu extracellulaire. Sa distribution ubiquitaire ainsi que son métabolisme versatile lui confèrent la capacité de coloniser le sol, l'eau, les animaux, l'humain et les plantes (Burns *et al.*, 2001). Elle vit à l'état saprophyte et peut être retrouvée sous forme planctonique, mobile ou dans un biofilm, attachée à une surface inerte ou une source de nutriment.

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste important pour l'humain, il peut être cause d'infections chez les individus immunodéprimés tel que les brûlés, les sidéens, les cancéreux sous chimiothérapie ou ceux atteints de fibrose kystique (FK) (Jayasimha Rao *et al.*, 2011). Ce microorganisme est un moteur notable de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose ainsi qu'une cause primaire d'infections chronique chez les patients ayant une bronchiectasie, cette dernière est associée à de sévères détériorations fonctionnelles pulmonaires.

Il commence aussi à être reconnu comme un marqueur d'inflammations intenses des voies respiratoires dans les maladies pulmonaires obstructives chroniques (COPD). La prévalence de *P. aeruginosa* dans les COPD est d'environ 4% et grimpe jusqu'à 8 à 13 % chez les patients avec une obstruction respiratoire plus avancée (Maria D. Macia *et al.*, 2005).

## II. La fibrose kystique

FK est la maladie génétique autosomique la plus fréquente chez les Caucasiens. Elle est de caractère héréditaire et récessif. Le gène en cause a été identifié en 1989 et localisé sur le chromosome 7. Il code pour une protéine nommée la CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), impliquée dans le transport des ions chlorures.

Plus de 700 mutations affectant ce gène ont été identifiées en mai 1997 par le Consortium d'Analyses Génétique (Genetic Analysis Consortium), la mutation la plus importante est une délétion de la phenylalanine en position 508 ( $\Delta 508$ ).

La fréquence des porteurs hétérozygotes a été estimée à 1 :30 alors que 60% des patients atteints de FK sont homozygotes pour cette mutation. Elle se traduit par la combinaison d'une sécrétion faible ou nulle de chlorure avec une augmentation d'absorption de sodium dans les voies respiratoires.

À cette issue, une viscosité anormale des sécrétions broncho-pulmonaires interférant avec la clairance mucociliaire des bactéries (Nicole Renders et al., 2001)(figure n°1). Les problèmes de transport du chlorure peuvent tout aussi toucher le pancréas, le foie, les intestins et l'appareil reproducteur, et ils accroissent la teneur en sel des sécrétions sudoripares.

L'obstruction du flux d'air est une caractéristique clé de la fibrose kystique, elle est due au blocage des bronches par des sécrétions purulentes, à l'épaississement de la paroi des bronches dû à l'inflammation et plus tard à la destruction des voies aériennes (Lillian Sholtis Brunner et al. 2006).

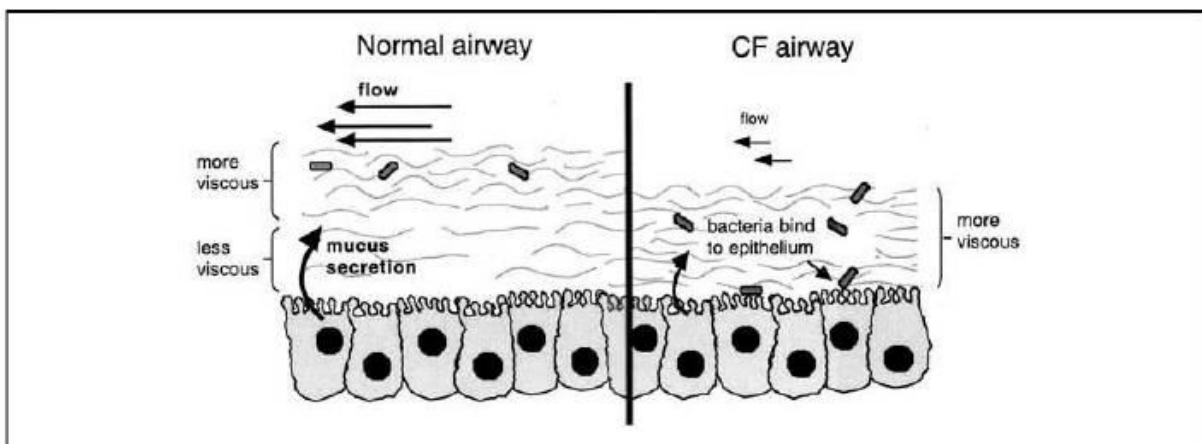


Figure n°1 : Comparaison de la clairance mucociliaire chez un sujet sain (normal airway) et chez un patient atteint de mucoviscidose (CF airway) d'après Lyczack et al ; 2002.

### ➤ **Les manifestations cliniques :**

- Pulmonaires

Pour les voies respiratoires les manifestations progressent depuis l'enfance et sont souvent cause de mort dès cette période. Ils se traduisent notamment par : une toux productive, sibilant et surtension du champ pulmonaire (Lillian Sholtis Brunner et al. 2006). En plus de l'obstruction des branches, le mucus anormal peut causer la dilatation de celles-ci (la bronchiectasie) et une infection due le plus souvent au staphylococcus aureus, haemophilus influenzae ou *P. aeruginosa*. L'infection peut être à l'origine de cavernes. La mort survient le plus souvent suite à une insuffisance respiratoire (Jamie Weir, Alison D. Murray ; 1999)

- Extra-pulmonaires :

Pour l'appareil gastro-intestinal et hépato-biliaire on peut observer : insuffisance pancréatique, un syndrome d'occlusion intestinale distale, un prolapsus rectal, une pancréatite et une cirrhose biliaire multilobaire. Les conséquences sur l'appareil endocrinien sont le diabète et la puberté différée et enfin l'appareil reproducteur, chez l'homme on constate une azoospermie obstructive alors qu'on observe chez la femme un mucus cervical épais (Jocelyne Derelle ; 1998).

### ➤ **Traitement :**

Les atteintes les plus importantes de la fibrose kystique sont celles touchant l'appareil respiratoire et les infections bactériennes qui en découlent ; de ce fait des antibiotiques sont régulièrement prescrits pour maîtriser les infections et l'exacerbation respiratoire aiguë, selon la gravité la voie d'administration peut être orale, intraveineuse ou par aérosol (Lillian Sholtis Brunner et al. 2006). Les molécules actives sur *P. aeruginosa* sont les B-lactamines (pipéracilline, ceftazidime, céfépime, imipénème...), les Aminosides (tobracycline, amikacine), les Fluoroquinolones (ciprofloxacine) et les polymyxines telles que la colistine (Rozenn Le Berre. 2011). Des cultures et des tests de sensibilités sont aussi un moyen d'orientation pour l'antibiothérapie.

Malgré les avancées considérables dans le domaine de l'antibiothérapie, la seule molécule qui a été approuvée comme spécifique à la FC est l'Ivcaftor. Il améliore la fonction pulmonaire de 4 à 5 % des patients porteurs d'une mutation



spécifique du CTFR, la G551D. le G551D est un canal présent dans la membrane plasmique mais avec une faible fonctionnalité (Gerald B. Pier. 2012).

L'obstruction des voies aériennes constitue le deuxième volet de la thérapie, il comporte des bronchodilatateurs et diverses techniques respiratoires, notamment le drainage postural manuel, la percussion et la vibration thoracique ainsi que des agents mucolytiques visant à diminuer la viscosité et améliorer l'évacuation des sécrétions. L'emploi régulier d'aérosol de desoxyribonucléase recombinante humaine (rhDNse) permet la digestion de l'ADN libéré par les neutrophiles altérés par l'infection bactérienne dans les voies bronchiques en diminuant la viscosité des sécrétions.

Des anti-inflammatoires sont aussi prescrits pour diminuer l'inflammation et la destruction évolutives des voies aériennes ainsi qu'une oxygénothérapie pour traiter l'hypoxie accompagnant la fibrose kystique. Dans certains cas la transplantation d'un poumon peut être une option envisageable mais les résultats sont variables et le manque de donneur reste un problème non résolu.

Enfin la thérapie génique prometteuse qui constitue en un transport de gènes sains dans les cellules endommager et corriger le déficit (Lillian Sholtis Brunner et al. 2006).

### ➤ **P. aeruginosa et la fibrose kystique :**

La fibrose kystique constitue un terrain favorable pour l'infection par *P. aeruginosa* :

- ✓ la colonisation est facilitée par la viscosité élevée du fluide respiratoire qui inhibe le battement des cils et donc l'élimination des micro-organismes (Lyczak *et al.*, 2002; Roger *et al.*, 1999; Wills *et al.*, 1997)
- ✓ L'adhésion se fait grâce à des pilines et flagellines qui jouent le rôle de ligands pour les récepteurs des cellules épithéliales. L'importance des lésions du tissu pulmonaire observée chez les patients FK est associée à une augmentation de l'adhérence de *P. aeruginosa* à l'épithélium pulmonaire (Baltimore *et al.*, 1989; Plotkowski *et al.*, 1991; Saiman *et al.*, 1992)
- ✓ La persistance est assurée par la combinaison d'un certain nombre d'éléments notamment, le dysfonctionnement du système de transport qui conduit à des concentrations élevées des ions de chlorure, inhibant de ce fait l'activité des peptides antimicrobiens ( $\beta$ -défensine de type 1), du

lysozyme et de la lactoferrine (Goldman *et al.*, 1997; Joris *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996). Ces conditions affectent également les PMNs qui présentent des défauts de phagocytose ainsi qu'un taux d'apoptose plus élevé (Tager *et al.*, 1998). Ajouté à cela l'altération de la protéine CFTR qui est censée permettre l'internalisation de la bactérie par les cellules épithéliales pulmonaires (Darling *et al.*, 2004), qui desquamèrent pour être ensuite éliminées par le mécanisme de clairance mucociliaire. Cette altération réduit son efficacité de 10 à 50 fois (Pier *et al.*, 1996). Ces éléments réunis assurent la persistance de la bactérie.

### **III. L'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa*:**

La survie de *Pseudomonas aeruginosa* dans la fibrose kystique est basée sur une adaptation génétique résultante de l'ensemble des mutations touchant des gènes spécifiques ; ce qui peut lui conférer un avantage pour assurer sa pérennité dans les poumons. Les mutations les plus fréquemment rencontrées sont : l'inactivation du régulateur MucA (la biosynthèse de l'alginate), la mutation du gène LasR (quorum sensing) et la mutation du répresseur MexZ (la pompe à efflux multi-drogues MexXY) suivies de l'inactivation du système de réparation de l'ADN : le DNA mismatch repair system (MRS). Ce dernier dysfonctionnement est très hautement prévalent dans les isolats de *P. aeruginosa* à partir d'échantillons de fibrose kystique. Il induit l'apparition de phénotypes à très grande mutabilité, ce qui contribuerait au phénomène d'adaptation par l'augmentation du pourcentage de mutations (Sofia Feliziani *et al.* ; 2010).

#### **1) La biosynthèse de l'alginate :**

L'alginate est un exopolysaccharide, polymère de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-glucuronique (Jayasimha Rao *et al.* 2011). Sa synthèse se fait grâce à l'expression du gène algD qui appartient à l'opéron algD-algA et code pour l'enzyme GDP mannose déshydrogénase, responsable de la synthèse de l'alginate.

Le gène algT induit l'expression de algD en codant pour un facteur sigma. AlgT appartient à un opéron avec 4 autres gènes : mucA, mucB, mucC et mucD ces derniers codent pour des facteurs anti-sigma et donc régulent négativement

l'expression de algD en liant algT. Les mutants mucA sont hautement mucoïdes et sont plus fréquemment rencontrés que mucB et mucD.

La surproduction de l'alginate permet la persistance de *Pseudomonas* dans les poumons. Les diverses conditions de stress qui peuvent exister dans un poumon atteint de FK tel que : l'hypoxie, l'osmolarité élevée, la déshydratation, le manque de nutriments et les antibiotiques peuvent affecter la production de l'alginate et même sélectionner des souches mucoïdes.

Malgré l'avantage qu'ont les souches mucoïdes face aux souches non-mucoïdes les deux sont isolées simultanément des expectorations (figure n°2). Les phénotypes non-mucoïdes sont issus soit de *P. aeruginosa* sauvage ou d'une reconversion de souches mucoïdes. Cette reconversion est observée in vitro dans l'absence de la pression sélective ou in vivo chez les patients atteints de FK au dernier stade, cela est plausible vu le coût énergétique très élevé de la production de l'alginate.

La reconversion est expliquée in vitro par une réparation du gène mucA ou par une mutation d'un site secondaire qui est souvent une inactivation du gène algT. Par contre ; cette mutation du site secondaire est totalement absente in vivo, ce qui laisse croire qu'elle est moins profitable pour la survie de la bactérie dans les poumons et qu'alors la reconversion est due à une mutation d'un site secondaire autre que algT.

algT réprime l'expression du flagelle dans les souches mucoïdes – probablement du à l'inutilité de la mobilité dans un biofilm- alors sachant que les souches reconverties redeviennent mobiles après l'inactivation du gène algT et que cette mobilité est défavorable dans l'environnement hostile des poumons, ceci pourrait peut être expliquer la faible fréquence ou l'absence des reconversions par l'inactivation de l'algT in vivo (Michael Hogardt et al. ; 2010). La perte de mobilité est donc une forme d'adaptation (Sofia Feliziani et al. ; 2010)(figure n°3).



**Figure n°2 : Colonies de *Pseudomonas aeruginosa* non-mucoïdes (A) et mucoïdes (B).**

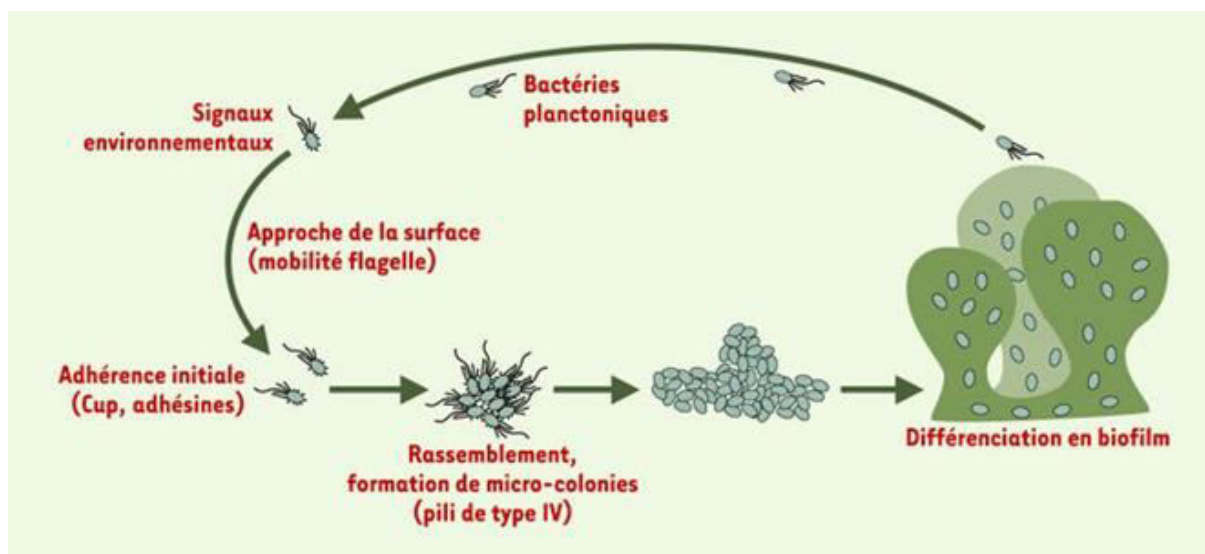


Figure n°3 : Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*. (Filloux et Vallet, 2003)

## 2) La mutation du gène LasR :

Une autre mutation fréquemment observée est celle du gène *lasR* codant pour le régulateur central du quorum sensing (QS) (Lei Yang et al.; 2011). Le quorum sensing est un processus de coordination de densité cellulaire bactérienne par diffusion de signaux chimiques. Chez plusieurs bactéries Gram négatifs ces signaux sont des acyl-homoserines lactones (acyl-HSL). Deux types ont été identifiés chez *P. aeruginosa* : le *N*-(3-oxododecanoyl)-HSL (3OC12-HSL) et le *N*-butyryl-HSL (C4-HSL). Ils sont produits respectivement par les deux enzymes LasI et RhlI pour être accumulés dans l'espace intra et extracellulaire pendant la multiplication bactérienne.

Arrivés à une certaine concentration, ces signaux se lient à leurs facteurs de transcription apparentés respectifs : LasR et RhlR. Ceci formera deux circuits à caractère hiérarchique selon lequel le système LasI-LasR contrôlerait le système RhlI-RhlR. Des études ont établi que ces systèmes réguleraient des centaines de gènes incluant ceux codant pour des facteurs de virulence tel que des enzymes extracellulaires (LasA protéase, élastase, protéase alcaline, lipase, phospholipase C), des métabolites secondaires (l'hydrogène cyanide, la pyocyanine) ainsi que des toxines (exotoxine A) (Sandoz *et al.*, 2007).

Tout comme la mutation du *mucA*, l'élimination du QS réduirait la toxicité de *P. aeruginosa* ce qu'il lui est favorable pour une colonisation à long-terme.

De plus la mutation du LasR à un résultat métabolique bénéfique comme celui de l'utilisation de certains acides aminés (D'Argenio *et al.*, 2007).

Il a aussi été récemment constaté que les mutants LasR montraient une meilleure adaptation s'ils se développaient dans des milieux manquant d'oxygène ou en présence d'antibiotiques (Hoffman *et al.*, 2010).

Plusieurs échantillons d'expectorations montrent les deux phénotypes, le sauvage et le QS déficient dans les populations de *P. aeruginosa*.

Une étude a également démontré que le QS est un fardeau métabolique pour la bactérie pendant la phase de développement où ce système est requis. Ceci suggère que les variantes déficientes de ce système présenteraient un profil de tricheurs ou « social cheaters ». Les cheaters de la sous population de *P. aeruginosa* sont des individus qui tirent profit du trait social (comme la production de siderophores extracellulaires) tout en contribuant moins que la moyenne au coût énergétique (Sandoz *et al.*, 2007).

Cependant, le mécanisme précis de l'évolution du QS dans la fibrose kystique reste encore à clarifier (Lei Yang *et al.*; 2011).

### 3) Le Système de Sécrétion de type 3 (SST3) :

Le SST3 a été mis en évidence pour la première fois chez *Yersinia enterocolitica* (Michiels *et al.*, 1990). Il est synthétisé par différentes bactéries Gram négatives pathogènes pour l'Homme telles que *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *P. aeruginosa*, et pour les plantes telles que *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris*.

Appelé également injectisome, c'est une nanomachine protéique complexe qui permet l'injection de protéines effectrices ou exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles eucaryotes (Cornelis, 2006; Galan and Collmer, 1999)(figure n°4). Le SST3 de *P. aeruginosa* a été découvert en 1996 (Yahr *et al.*, 1996). Plus de 40 gènes associés en plusieurs opérons sont nécessaires à la fonctionnalité du SST3.

La fonction du SST3 est différente d'une espèce à l'autre. Dans le cas de *Salmonella* et de *Shigella*, son rôle premier est d'induire l'internalisation des bactéries dans les cellules non phagocytaires, alors que dans le cas de *P. aeruginosa*, le SST3 bloque les processus phagocytaires, induit la mort cellulaire et permet la dissémination des bactéries dans l'organisme.

La présence du SST3 dans les souches de *P. aeruginosa* est de mauvais pronostic puisque les risques de mortalité sont augmentés d'un facteur six (Roy-

Burman *et al.* 2001). Il est majoritairement associé aux infections aiguës de la cornée, de la vessie ou dans certaines pneumopathies.

La présence d'un SST3 fonctionnel induit une mortalité importante chez la souris et joue également un rôle important pour la dissémination du pathogène (Le Berre *et al.* 2011)

L'analyse de différentes souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose a montré que l'expression des éléments du SST3 (effecteurs et translocateurs) diminuait au cours de l'infection, laissant place à l'expression des alginate et des molécules du quorum sensing, très présentes lors des infections chroniques chez ces patients (Hauser *et al.* 2011; Jain *et al.* 2004). Des observations similaires ont été effectuées dans un modèle murin (Pierre *et al.* 2008).

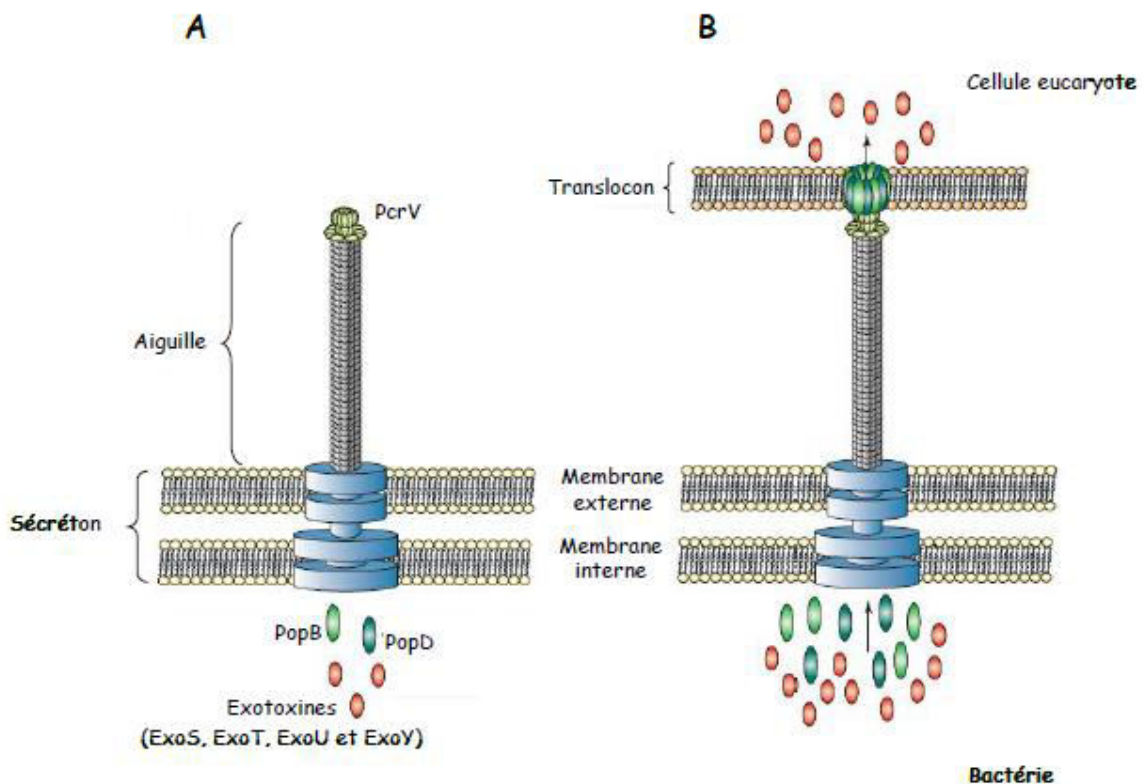


Figure n° 4 : Le SST3 de *P. aeruginosa* avant et après un contact avec la cellule cible (Cornelis, 2006)

**A.** Le SST3 de *P. aeruginosa* est composé d'un sécréton (ou corps basal) traversant la membrane interne et externe de la bactérie, et de l'aiguille formée par l'oligomérisation d'une seule protéine PscF. Le sommet de l'aiguille est constitué de la protéine PcrV.

**B.** Suite au contact avec la cellule cible, les protéines PopB et PopD traversent l'aiguille, s'oligomérisent et forment un translocon à l'extrémité de l'aiguille. Cette structure en forme

d'anneau s'insère dans la membrane des cellules eucaryotes. Le pore ainsi formé permet la translocation des protéines effectrices.

#### 4) La résistance aux antibiotiques :

##### ➤ Les systèmes d'efflux:

Il est clair aujourd'hui que la résistance multi-drogues est le résultat de la synergie entre la perméabilité membranaire et les pompes à efflux multi-drogues à origine chromosomique. Ces pompes permettent d'exporter en plus des antibiotiques divers colorants, détergents, inhibiteurs, solvants organiques et des homoserines lactones inclus dans le QS.

Les systèmes d'efflux sont répartis en 5 familles en fonction de leurs similitudes de séquences en acides aminés et de l'énergie requise pour le transport. En effet, l'efflux de diverses molécules vers le milieu extra-cellulaire est un processus dynamique utilisant, soit l'hydrolyse de l'ATP, soit le gradient électrochimique membranaire par le biais d'un antiport. Ainsi, (i) les transporteurs de la famille ABC (*ATP Binding Casette*) utilisent l'ATP comme source d'énergie, (ii) les transporteurs de la famille MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*) utilisent un antiport d'ions  $\text{Na}^+$ , (iii) les transporteurs de la famille MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) et RND (*Resistance Nodulation cell Division*) utilisent un antiport d'ions  $\text{H}^+$  (figure n°5).

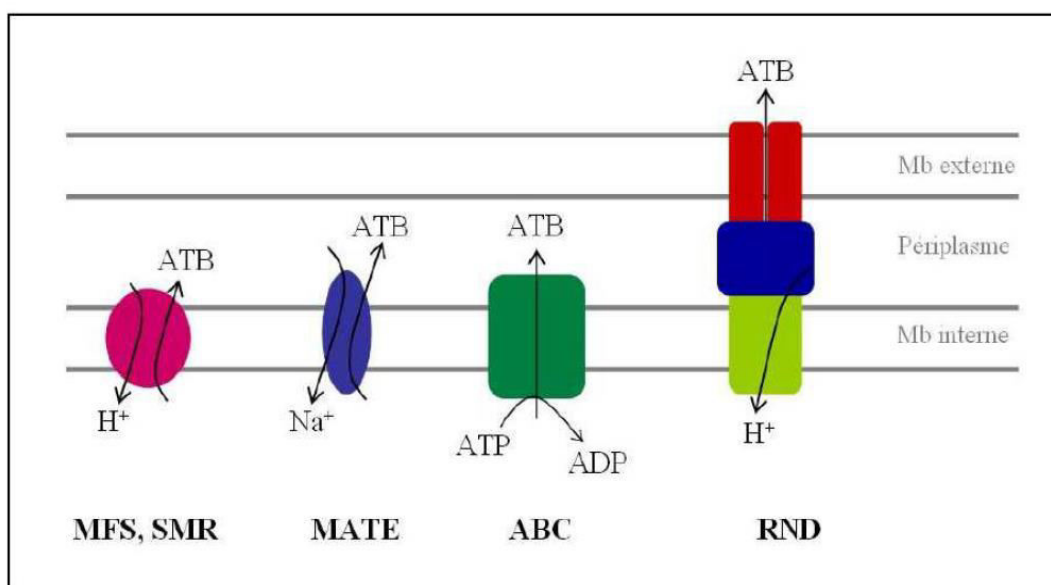


Figure n°5 : Représentation schématique des différentes familles de systèmes d'efflux actif chez les bactéries à Gram- (Pool ; 2004).

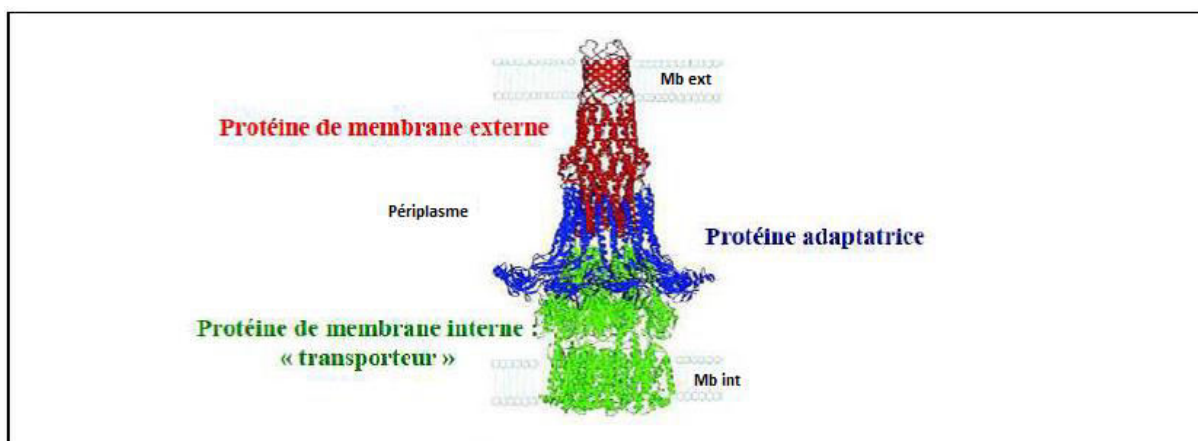


Figure n°6 : Organisation structurale d'un système d'efflux actif tripartite de la famille RND (Akama et al ; 2004)

Chez les bactéries à Gram-, les systèmes de la famille RND jouent un rôle particulier dans la résistance aux ATBs (Pool 2004 ; Pool 2005). Dix systèmes appartenant à cette dernière ont été identifiés chez *Pseudomonas* (Li and al. 2003). Chaque système caractérisé par sa spécificité de substrat (tableau), est formé de l'assemblage de 3 éléments : (i) une protéine insérée dans la membrane cytoplasmique (Mb int) jouant le rôle de transporteur, (ii) une protéine en forme de canal traversant la membrane externe (Mb ext) et (iii) une protéine adaptatrice reliant les deux précédentes (figure n°6) (Zgurskaya and Nikaido ; 2000).

Tableau n°1. Principaux substrats des systèmes d'efflux actifs de *P. aeruginosa*.

Systèmes d'efflux	Principaux antibiotiques substrats	Références
MexAB-OprM	$\beta$ -L, Tet, Tig, FQ, Chl, Ery, Tmp, Sul, Nov, Fus ...	(Li <i>et al.</i> 1994 <sup>115</sup> ; Li <i>et al.</i> 1995 <sup>116</sup> ; Masuda <i>et al.</i> 2000 <sup>140</sup> )
MexCD-OprJ	Tet, Tig, FQ, Ery, Chl, Fep, Caz, Cpm...	(Poole <i>et al.</i> 1996 <sup>176</sup> ; Masuda <i>et al.</i> 2000 <sup>139</sup> )
MexEF-OprN	Tet, FQ, Chl, Ery, Tmp...	(Köhler <i>et al.</i> 1997 <sup>106</sup> )
MexJK/OprM	Tet, Ery	(Chuanchuen <i>et al.</i> 2002 <sup>29</sup> )
MexGHI-OmpD	Tet, FQ	(Aendekerck <i>et al.</i> 2002 <sup>1</sup> ; Sekiya <i>et al.</i> 2003 <sup>201</sup> )
MexMN/OprM	Chl	(Mima <i>et al.</i> 2005 <sup>149</sup> )
MexPQ-OmpE	FQ, Ery	(Mima <i>et al.</i> 2005 <sup>149</sup> )
MexXY/OprM	Tet, FQ, AG, Fep, Ery, Tig	(Aires <i>et al.</i> 1999 <sup>2</sup> ; Mine <i>et al.</i> 1999 <sup>150</sup> ; Westbrook-Wadman <i>et al.</i> 1999 <sup>233</sup> ; Masuda <i>et al.</i> 2000 <sup>139</sup> ; Dean <i>et al.</i> 2003 <sup>38</sup> )
MexVW/OprM	FQ, Ery, Tet, Chl	(Li <i>et al.</i> 2003 <sup>119</sup> )

$\beta$ -L,  $\beta$ -lactamines (sauf imipénème) ; Tet, Tétracycline ; Tig, Tigécyline ; FQ, Fluoroquinolones ; Chl, Chloramphénicol ; Ery, Erythromycine ; Tmp, Triméthoprime ; Sul, Sulfamides ; Nov, Novobiocine ; Fus, Acide fusidique ; Fep, Céfépime ; Caz, Céfazidime ; Cpm, Cefpirome ; AG, Aminosides.



Un exemple de l'adaptation se traduit par le gène MexZ qui régule négativement la transcription du système MexXY-OprM ; une délétion dans le gène répresseur conduirait à une hyperproduction de la pompe à efflux et donc à une plus grande résistance (Keith Poole; 2001).

### ➤ La résistance aux B-lactamines

Les B-lactamines ont pour cible la PLP (Protéine Liant la Pénicilline) qui est une enzyme essentielle à la synthèse du peptidoglycane, et donc de la paroi bactérienne. Leur action empêche l'enzyme d'accomplir la transpeptidation et la transglycosylation, étapes terminales de la production du peptidoglycane. La bactérie neutralise leur action en diminuant sa perméabilité membranaire, une surproduction de systèmes d'efflux, une sous production de PLP ou de surproduction de PLP altérées ce qui lui confère une résistance sélective selon le type de PLP endommagé. Ou encore en produisant des enzymes inactivatrices ; les B-lactamases.

- Les B-lactamase :
- La surproduction de la céphalosporinases AmpC :

La presque totalité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent une céphalosporinase de classe I nommée AmpC. Codée par un gène chromosomique dont l'expression est inductible (résistance phénotypique instable). La production de cette enzyme contribue fortement à la résistance naturelle de la bactérie à l'ampicilline, à l'amoxicilline, aux céphalosporinases de première et deuxième génération (C1G, C2G), ainsi qu'au céfotaxime et à la ceftriaxone (Bert and Lambert-Zechovsky ; 1996).

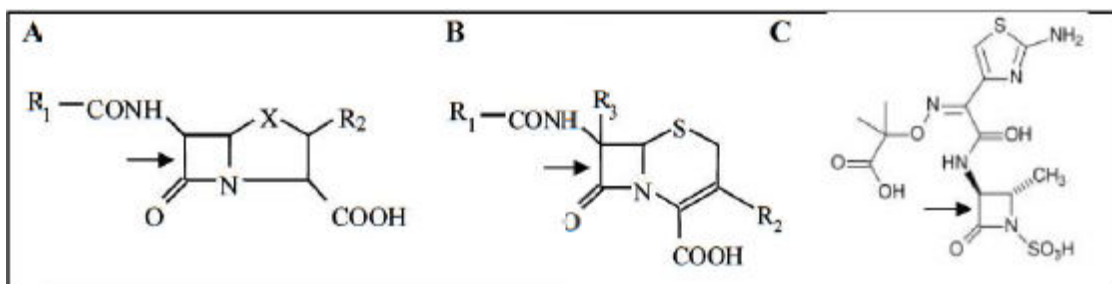


Figure n°7. Structure générale des B-lactamines (Kong et al ; (2005).

(A) Pénames, X=S, Pénèmes, X=C ;

(B) Céphjèmes, R3=H ;

(C) Aztréoname (Monobactame),

Le cycle B-lactame est indiqué par la flèche.

- Production d'autres B-lactamases :

L'inactivation du gène AmpC chez la souche PAO1 n'a que peu d'effet sur la sensibilité aux pénicillines, au méropénème, et au céfotaxime ; Kong et al ont émis l'hypothèse de l'existence B-lactamase chez *P. aeruginosa* également codée par un gène chromosomique (Kong et al. 2005). Les auteurs ont ainsi identifié une protéine présentant une forte homologie avec les B-lactamases de classe D (oxacillinasés). Cette enzyme nommée PoxB ou encore Oxa-50 a aussi bien été détectée chez des souches environnementales que chez des isolats clinique CF et non-CF ; elle confère à *P.aeruginosa* une résistance très modeste aux méropénèmes et aux autres pénèmes (Girlich et al. 2004 ; Kong et al.2005)

- Les porines :

Pour atteindre la membrane interne les B-lactamines doivent traverser la membrane externe par des porines non spécifiques essentiellement la porine OprF qui très conservée, permet la diffusion lente de divers solutés. D'autres porines existent tel que la OprD1 qui permet le passage du glucose et ces analogues structuraux ainsi qu'une faible diffusion de l'imipénème (Trias and Nikaido ; 1990). La porine OprD2 quant à elle assure le passage d'acides aminés basiques ainsi que les carbapénèmes. Dès lors, son absence ou son dysfonctionnement causerait une résistance sélective aux carbapénèmes (Giske et al ; 2008). Ce type de phénomène semble très fréquent chez les patients atteints de mucovécidose (Mérens et al ; 2009).

#### ➤ **La résistance aux aminosides :**

- Les aminosides :

Le passage des aminosides à travers la membrane externe s'effectue par la bicouche lipidique et non par la voie des porines. Comme c'est le cas de la plupart des antibiotiques (B-lactamine, fluoroquinolones, tetracyclines...). En effet les aminosides établissent des relations électrostatiques avec les LPS. Grâce à leurs nombreuses charges électropositives, les aminosides se fixent sur les groupements phosphates et pyrophosphate du core, et de ce fait, déplacent les ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  qui assurent normalement la cohésion entre les molécules adjacentes du LPS (Hancock and Wong ; 1984 ; Rocchetta et al. 1999).

La déstabilisation transitoire de l'arrangement des molécules du LPS suffit à ces antibiotiques plans et flexibles pour s'insérer dans la bicouche lipidique et atteindre l'espace périplasmique (Kadurugamuwa et al ; 1993). Leur action

antibactérienne, bien que complexe s'exerce essentiellement sur le ribosome en bloquant ou en perturbant la synthèse protéique. Par exemple, la fixation de certains aminosides sur la sous-unité 30S du ribosome perturbe la reconnaissance codon-anticodon et conduit à la formation de peptides aberrants, non-fonctionnels. L'accumulation de ces peptides dans la cellule s'avère finalement létale pour la bactérie (Mingeot-Leclercq et al ; 1999).

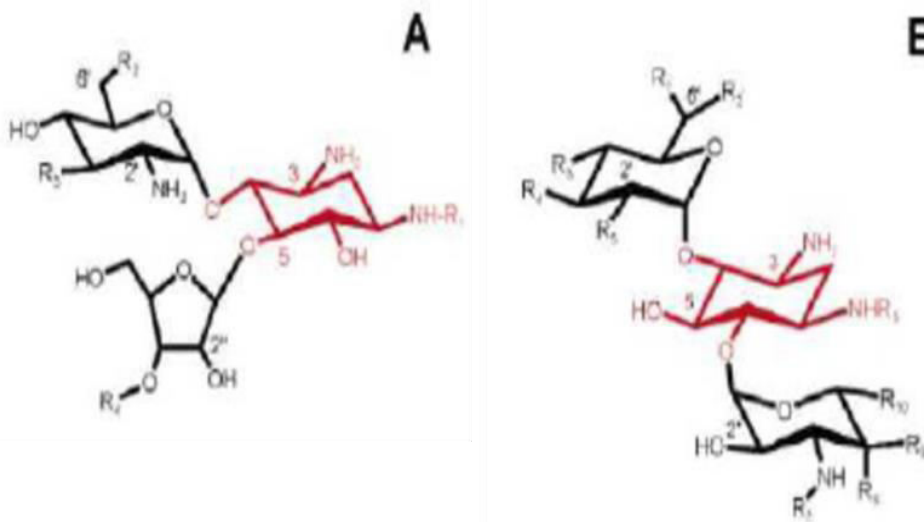


Figure n°8 : Structure des aminosides à noyau 2-déoxystreptamine (en rouge). (Magnet and Blanchart ; 2005)

- Les enzymes modificatrices des aminosides :

Les aminosides se fixent sur le ribosome grâce à leurs fonctions –OH et –NH<sub>2</sub>. La modification enzymatique de certaines de ces fonctions par la bactérie peut donc réduire fortement l'affinité de l'antibiotique pour la cible, créant un état d'insensibilité. Trois catégories d'enzymes modificatrices ont été décrites chez *P. aeruginosa* : les amino-acétyl-transférases (AAC) qui neutralisent la fonction –NH<sub>2</sub>, les phospho-transférases (APH) et les nucléotidyl-transférases (ANT) qui neutralisent la fonction –OH (figure n°9) (Mingeot-Leclercq et al ; 1999).

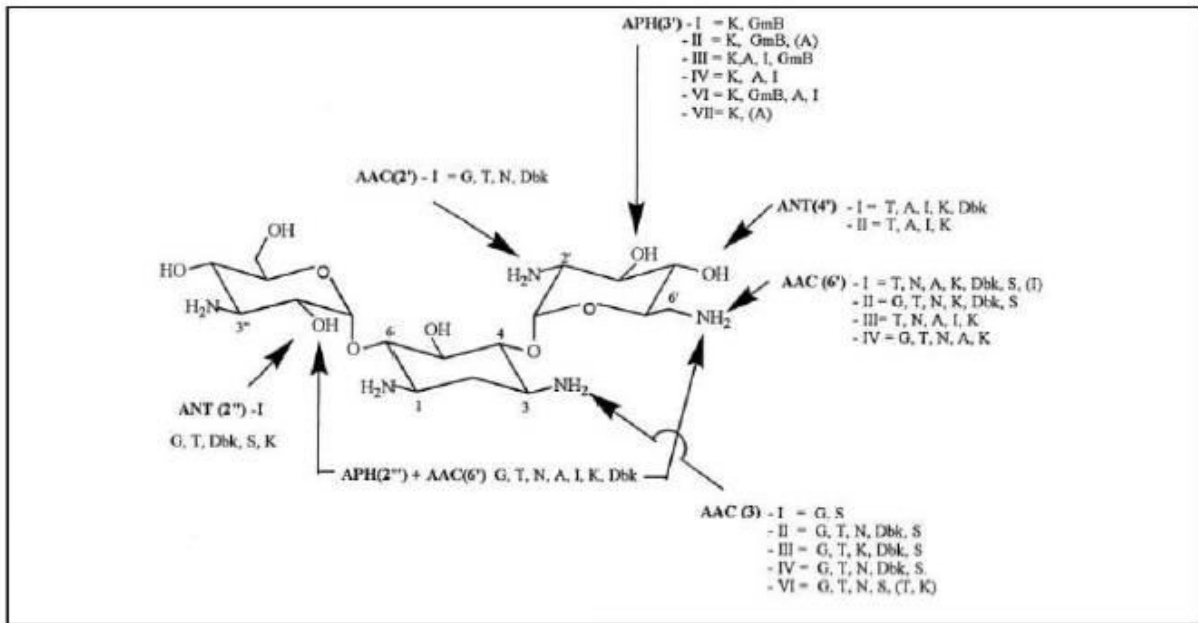


Figure n°9 : Principales enzymes modificateuses des aminosides (Mingeot-Leclercq et al ; 1999).

A. Amikacine, G. Géntamicine, GmB. Géntamicine B, T. Tobramicine, N. Nétilmicine, K. Kanamicine, I. Isépamicine, S. Sisomicine, DBK. Dibékacine.

- La modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS) :

- Le LPS :

Les LPS qui forment l'essentiel du feuillet superficiel de la membrane externe comprennent (i) une partie lipidique nommée lipide A. (ii) une pièce intermédiaire appelée core, (iii) un polymère saccharidique portant l'antigène O (figure). Le lipide A est un disaccharide constitué de deux résidus glucosamine substitués par 5 à 7 résidus d'acides gras à longues chaines. Cet élément toxique assure l'ancrage de la molécule du LPS dans la membrane externe (Wilkinson 1996). Le core fait le lien entre le lipide A et les chaines polysaccharidiques. Il comprend des molécules de sucre fortement phosphorylées. Ce qui confère un caractère électro-négatif à la membrane externe. Cette propriété favorise l'interaction des agents antibactériens polycationiques comme les aminosides et les polymixines (Hancock and Wong 1984 ; Wilkinson 1996).

- La modification :

La modification structurale du LPS peut être à l'origine d'une résistance à bas niveau aux aminosides. Chez les mutant FE49, dérivant de la souche PAO1, les

molécules du LPS sont privées de leur partie poly-saccharidique et d'une partie du core qui tend à éliminer les charges électro-négatives avec lesquelles les aminosides interagissent pour franchir la membrane externe. Il en résulte alors une augmentation du niveau de résistance aux aminosides d'un facteur 2 comparativement à la souche PAO (El'Garch et al. 2007).

- La méthylation de l'ARN16S :

La méthylation ribosomale est un mécanisme développé par les organismes producteurs d'aminosides (actinomycètes). Il s'effectue sur le résidu G en position 1405 de l'ARN16S au niveau du site A (Galimand et al. 2003). Le premier cas de résistance a été décrit chez des souches cliniques isolées au Japon. A ce jour, plusieurs gènes codant pour la méthylases de ce type ont été identifiées chez *P. aeruginosa*. Ces souches sont notamment résistantes à la tobramycine, l'amikacine, la gentamycine et à l'arbécacine possèdent un gène *rmtA* codant une méthylase homologue à celle produites par les actinomycètes. Il semble que le gène *rmtA*, porté par un transposon situé sur un plasmide conjugatif, ait diffusé à partir des actinomycètes (Yokoyama et al. 2003).

- **La résistance à la colistine :**

La colistine, antibiotique de la famille des polymyxines, est un polypeptide cyclique (figure n°10), cationique, ciblant les membranes bactériennes. Bien qu'ayant une activité intrinsèque intéressante vis-à-vis des bactéries à Gram-, cet antibiotique est peu utilisé en thérapeutique humaine en raison de sa néphrotoxicité (Falagas and Kasiakou ;2005). En revanche il est fréquemment administré, par voie inhalée. Au stade de la colonisation précoce ou intermittente chez les patients atteints de mucoviscidose pour tenter d'éradiquer *P. aeruginosa* dont les profils de résistance évoluent au fil du temps (Johansen et al. 2008 ; Mérens et al. 2009). Toutefois, depuis quelques années on remarque l'émergence de rares clones hautement résistants à cet antibiotique (CMI supérieure à 50 mg/L comparativement à la souche PAO1 dont la CMI est de 3 mg/L).

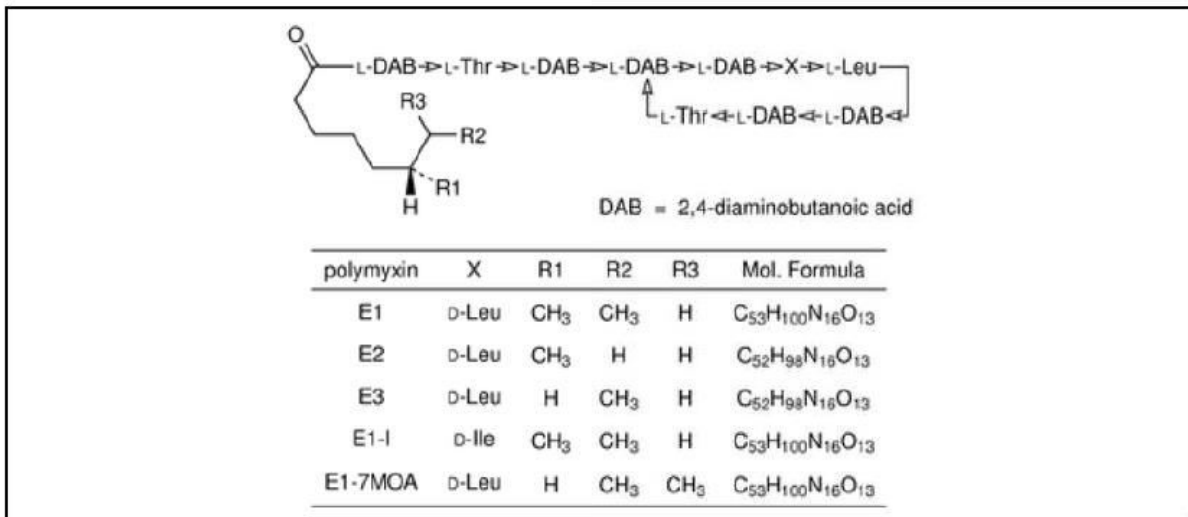


Figure n°10 : Structure de la colistine (polymyxine E1) (Falagas and Kasiakou ;2005).

Chez les isolats de CF de *P. aeruginosa*, la résistance est due à une modification du LPS (Johansen et al. 2008). En effet, la fixation de la colistine à la membrane externe est rendue possible grâce à des interactions électrostatiques entre le polycation et les groupements négatifs portés par les molécules du LPS. Par un mécanisme similaire à celui utilisé par les aminosides, la colistine franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite de composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatale pour la bactérie (Falagas and Kasiakou ;2005).

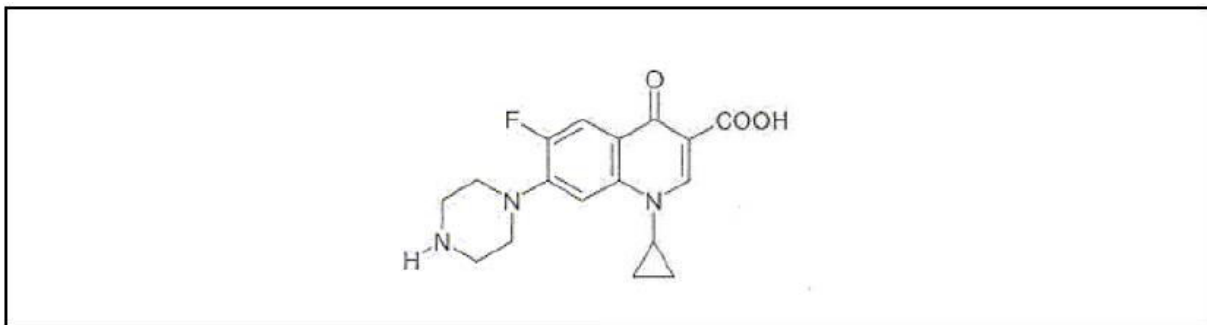
### ➤ La résistance aux fluoroquinolones :

- Les fluoroquinolones :

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse utilisés dans de nombreuses infections bactériennes en raison de leur pouvoir bactéricide rapide. Ces antibiotiques ont pour cible les topoisomérases bactériennes de type II : l'ADN gyrase et la topoisomerase IV. Bien que présentant de grandes homologues de structure et de séquences protéiques, ces deux fonction assurent des fonctions distinctes mais cruciales pour le maintien de la topologie de l'ADN. L'ADN gyrase, hétéro-tetramère constituées de deux sous unités GyrA et de deux sous-unités GyrB, introduit des surenroulements négatifs qui en

relâchant l'ADN, permettent la progression des ADN- et ARN- polymérase. La topoisomérase IV, constituées des sous-unités ParE et parC, assure quant à elle, la séparation des copies d'ADN circulaire double brin entre la cellule mère et la cellule fille après la réplication du chromosome ou des plasmides.

La fixation des quinolones sur ces cibles empêche la réplication et la transcription de l'ADN bactérien bloquant ainsi toute division cellulaire (LeVine et al. 1998). Toutefois, *P. aeruginosa* peut s'adapter par des mutations à cette famille d'antibiotiques en surproduisant divers systèmes d'efflux actifs, en diminuant l'affinité des cibles ou encore en réduisant la perméabilité membranaire (porines, LPS).



**Figure n°11 : Structure d'une fluoroquinolones (la ciprofloxacine) (LeVine et al. 1998).**

## 5) La déficience du mismatch repair system :

Un phénotype avec une très grande mutabilité a pu être observé chez des patients en Europe et en Amérique du Nord (la distribution géographique suggère que c'est un phénomène qui sévit partout dans le monde). Il est essentiellement lié aux infections chronique et n'a pu être isolé que rarement dans les échantillons d'infections aiguës (< 1%) ou de l'environnement, ce qui suppose qu'il est lié à l'adaptation génétique durant l'établissement de la persistance de *P. aeruginosa*.

Ce phénotype est dû à une déficience du système de réparation de l'ADN, le mismatch DNA repair system. Les gènes les plus touchés de ce système sont le gène mutL et mutS

Bien qu'une association de la mutabilité élevée avec la conversion mucoïde ou avec la mutation du gène lasR ait pu être établie, aucun lien direct avec une adaptation particulière n'a été démontré (incluant les gènes impliqués dans la résistance antimicrobienne et le gène lasR, le deuxième gène ayant montré un très grand pourcentage de mutations). Ces résultats démontrent que le phénomène d'adaptation de *P. aeruginosa* est complexe. Aussi on ignore toujours la façon exacte dont la bactérie acquiert ces mutations qui lui permettent de persister dans les poumons (Sofia Feliziani et al. 2010).

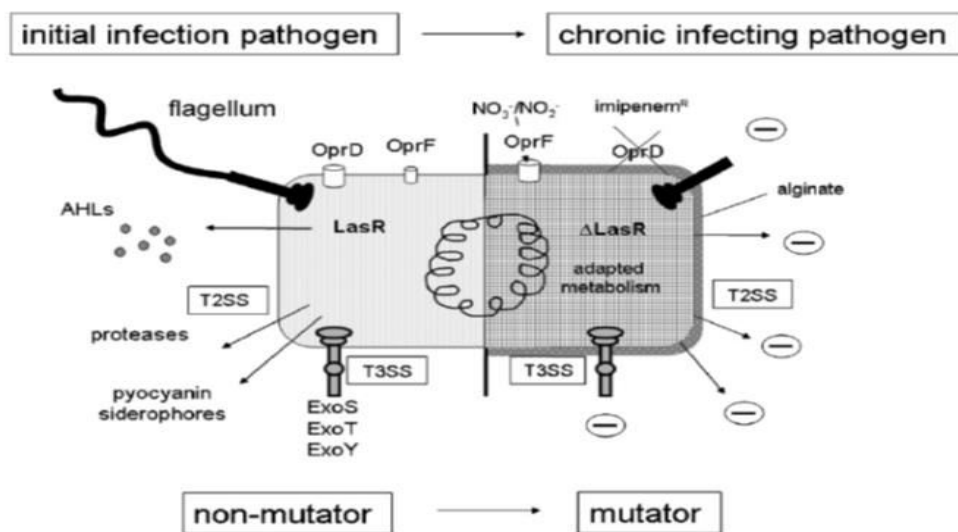
D'autres moyens d'adaptation ont été observés chez *P. aeruginosa* tel que la résistance au manque d'oxygène par l'utilisation du nitrate comme accepteur final d'électrons ou par l'expression d'enzymes essentiels pour une respiration anaérobie.

Une autre étude a reporté qu'une aptitude croissante pour l'utilisation de la leucine a été sélectionnée dans les voies aériennes ainsi que des gènes inclus dans le métabolisme des acides gras et du transport ont été régulés à la hausse (Son *et al.*, 2007, Hoboth *et al.*, 2009). A partir d'échantillons d'expectorations des investigations on pu détecter une induction à haut niveau de gènes inclus dans la dégradation de la phosphatidyl-choline ; qui est la molécule lipidique la plus abondante à la surface des poumons, ce qui peut indiquer que les lipides de la surface peuvent être une alternative nutritionnelle pour *P. aeruginosa* in vivo (Son *et al.*, 2007).



Parmi les mutations identifiées, plusieurs sont liées à une perte ou à une réduction des facteurs immunogènes tel que la mobilité induite par flagelle ou pilis (Smith *et al.*, 2006), l'antigène O, l'altération du lipide A, ou encore la sécrétion de substance antimicrobiennes comme les pyocines (David A. D'Argenio *et al.* ; 2007, Nicole Renders *et al.* ; 2001) (figure n°12).

L'atténuation des facteurs de virulence apparait comme une stratégie commune d'adaptation pour *P. aeruginosa* lui permettant de survivre aux réponses immunitaires intenses ; ce qui constitue une différence majeure entre l'infection chronique et aigüe (Lei Yang *et al.*; 2011).



**Figure n°12 : La transition de *P. aeruginosa* de sa forme initiale infectieuse vers la forme chronique en phase terminale de la mucoviscidose (Michael Hogardt and Jürgen Heesemann, 2010)**

Le fait que ces fonctions aient été désélectionnées met à jour un paradoxe car plusieurs d'entre elles sont considérées comme étant des « facteurs de virulence » ils sont donc indispensables pour l'infection. Historiquement, les fonctions avaient été définies comme « facteurs de virulence » s'ils sont importants pour l'infection aigüe. Cependant, les résultats de l'étude de Smith *et al.*, ainsi que d'autres investigations suggèrent qu'il faudrait peut être élargir le concept de « virulence » pour distinguer entre les facteurs requis pour l'infection chronique ou aigüe.

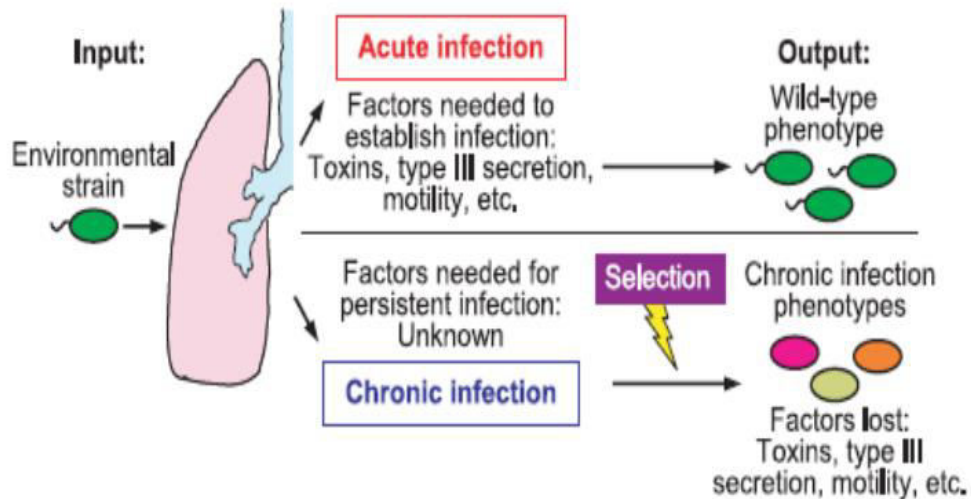


Figure n°13 : Evolution de la virulence de *P. aeruginosa* (Dao Nguyen et al . ; 2006).

Une vue plus complète pourrait désigner les fonctions par des « facteurs invasifs » si elles servent à promouvoir l’infection aiguë, ou de « facteurs de persistance » pour les fonctions assurant la dissémination et donc importantes pour l’infection chronique (figure n° 13). Les deux groupes sont indispensables pour la virulence, mais par deux manières différentes (Dao Nguyen et al ; 2006).

Le but de notre travail est d’établir le profil de l’expression génétique de *P. aeruginosa* dans les deux phases : aiguë et chronique afin de faire une comparaison qui nous permettrait de préciser les changements qui ont permis son adaptation, donc le passage d’une étape à l’autre.

## ***MATERIEL ET METHODES***

## **I. Matériel :**

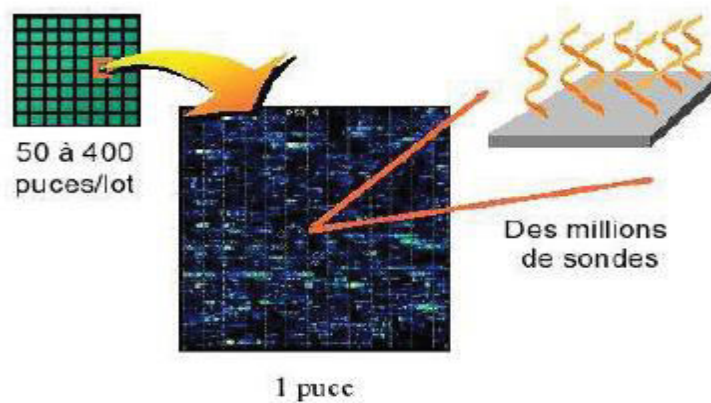
### **I. 1 Les puces à ADN :**

#### **I. 1. 1 Principe et types de puces à ADN**

Les puces à ADN sont une technique de d'identification moléculaire qui regroupe des techniques de biologie, de microélectronique, de d'analyse d'image et de bioinformatique. Leurs domaines d'applications sont très étendus et intéressent de nombreux secteurs de la recherche biologique notamment la génomique fonctionnelle, la recherche pharmaceutique, le génotypage, le diagnostic et le contrôle alimentaire (Olivier CROCE ;2005).

Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « DNA microarray » en anglais (de « array » = rang ordonné), est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le northern blot, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif. La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle.

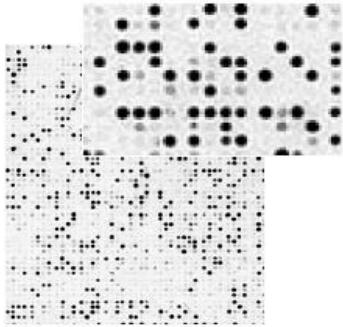
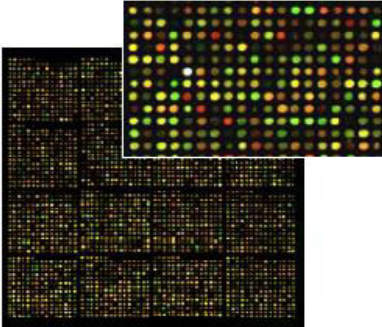
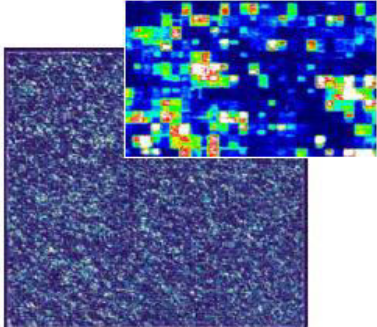
Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots » (de l'anglais spot=tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.



**Figure n° 14 : Une puce peut contenir de quelques dizaines de rapporteurs (sondes) à plusieurs millions (schéma de Zintilini C., 2003).**

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « macroarrays » par opposition aux « microarrays »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope.

On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées dans le Tableau (Alain NICOLAS; 2004)

« Macroarray »	« Microarray spottée »	« GeneChips » de Affymetrix
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : membrane de nylon</li> <li>- taille des spots : 0,5-1mm</li> <li>- densité : quelques centaines de spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR</li> <li>- cibles : ADNc avec marquage radioactif au <sup>32</sup>P</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression des gènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~100µm</li> <li>- densité : 1000-10000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers)</li> <li>- cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip, CGH-array</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~20µm</li> <li>- densité : jusque 250000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés <i>in situ</i></li> <li>- cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires</li> </ul>

**Tableau N°2 : Principaux types de puces à ADN**

Les deux principales utilisations des puces à ADN sont:

- les puces d'expression où chaque rapporteur reconnaît des gènes ou transcrits distincts au sein d'un même génome;
- les puces d'identification où chaque rapporteur reconnaît les variants d'un même gène issu de génomes différents (*Olivier CROCE ;2005*).

## **I. 1. 2. La fabrication des puces à ADN**

### **a) La fabrication de la puce**

La méthode de fabrication des puces « spottées » a été développée par l'équipe de P. Brown à l'Université de Stanford, aux Etats-Unis (DeRisi et al ; 1997). Elle est aujourd'hui bien établie et de nombreuses plate-formes de production sont implantées dans les laboratoires académiques. Des solutions d'ADN sont préparées soit par amplification PCR à partir du génome ou de banques d'ADN complémentaires, soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70 mers). Des micro-gouttelettes de ces solutions sont ensuite déposées par un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN.

En général, chaque spot de la matrice correspond à un gène donné. Les robots nécessaires à la fabrication de ces puces étaient construits à l'origine de manière artisanale dans chaque laboratoire selon le modèle conçu par J. DeRisi et dont les plans de montage et le logiciel de pilotage sont disponibles sur Internet (*Alain NICOLAS et al ; 2004*).

### **b) La fixation des sondes**

Il existe deux méthodes : le transfert de brins d'ADN (« off chip synthetis ») ou sa synthèse *in situ* (« Light directed in situ synthesis »).

- *Transfert de brins d'ADN :*

La synthèse préalable à la fixation des sondes permet de fixer des sondes relativement longues, atteignant 40 à 60 bases. Le transfert de ces sondes sur la puce peut se faire au moyen de micropipettes, de micropointes ou par des dispositifs de type jet d'encre.

- *La synthèse in situ :*

Dans ce cas, la construction des sondes se fait par dépôt de couches successives des quatre bases de l'ADN sur un support en verre. C'est un masque, dont la configuration varie à chaque dépôt d'une couche, qui permet aux bases de s'empiler correctement. Avec ce procédé, utilisé par Affymetrix, les sondes comportent au maximum 30 bases (*Viard Bruno et Errachid Céline ; 2006*).

### I. 1. 3. Préparation des échantillons, amplification, marquage et hybridation des cibles

#### **a) La préparation des acides nucléiques :**

Pour l'étude du transcriptome, l'ARN doit tout d'abord être purifié afin de limiter la contamination par l'ADN génomique, les protéines et les débris cellulaires qui peuvent perturber les différentes étapes enzymatiques d'amplification ou de marquage ainsi que l'hybridation.

#### **b) Amplification et marquage :**

En règle générale, 1 à 5 µg d'ARN total sont suffisants. L'utilisation de quantités plus faibles (100 ng à 1 µg) nécessite une double amplification associée à une augmentation du bruit de fond, donc à une diminution de la sensibilité. Le marquage des cibles peut être réalisé directement lors de la réaction de transcription inverse (*reverse transcription* ou RT) par incorporation de cytosine marquée (fluorescence ou radioactivité) dans les acides nucléiques néosynthétisés. Cependant, ce type de marquage nécessite une quantité de matériel de départ importante. Ou indirect par incorporation d'un nucléotide modifié amino allyl dUTP puis couplage du fluorochrome dans un second temps. Ceci se fait suite à la transcription inverse des ARNms permettant l'obtention d'un brin d'ADNc fluorescent.

#### **c) L'hybridation et lavage:**

Du fait de la complémentarité des nucléotides, le dépôt des cibles marquées sur la puce déclenche l'appariement des séquences sondes/cibles complémentaires. Cette hybridation, qui dure quelques heures en milieu liquide est suivie d'un lavage du substrat qui permet d'éliminer les cibles non fixées, ou fixées non spécifiquement et qui consiste en une immersion dans une série de tampons

Les paramètres essentiels pour limiter toute hybridation non spécifique sont la durée d'hybridation, la température, la stringence du tampon, la concentration de la sonde, l'encombrement stérique des sondes, la densité des dépôts et la séquence des sondes. L'hybridation est généralement réalisée sous agitation à 60 °C, pendant 10 à 17 heures, dans un tampon de haute Stringence. Après séchage la puce est passée au scanner pour repérer les hybridations (J.-M. BIDART et al ; 2007)



#### **I. 1. 4. La lecture ou acquisition des images**

La puce est alors révélée par lecteur (scanner) muni de lasers qui permettent d'exciter les molécules de fluorochrome et de détecter par microscope confocal le signal émis dans chaque spot. Dans le cas du marquage avec deux fluorochromes (vert Cy3 et rouge Cy5), une image numérique est acquise pour l'échantillon marqué avec le Cy3 et une en Cy5. Un spot de couleur verte indique un gène dont le niveau d'expression est plus élevé dans l'échantillon marqué avec le Cy3 que celui marqué avec le Cy5, et inversement pour un spot de couleur rouge. Le spot apparaît jaune lorsque le gène est exprimé de manière identique dans les deux échantillons comparés. L'analyse des données numériques issues de l'acquisition est effectuée par un logiciel qui prétraite, segmente et quantifie les différents niveaux d'activité dans les spots.

#### **I. 1. 5. L'analyse des données**

L'analyse d'image est aspect central des expériences menées à l'aide des à ADN. Dans le cas d'un double marquage, le but de cette phase est de quantifier, de manière relative le niveau d'expression des gènes. Cette mesure, basée sur un rapport d'intensité entre les deux niveaux de fluorescence détectés, est fonction de nombreux paramètres dépendant des méthodes utilisées, des mesures expérimentales et des conditions biologiques. Globalement, cette étape d'analyse a un impact considérable sur l'interprétation biologique des données et repose sur quatre phases.

##### **➤ La localisation des spots :**

Il s'agit ici de déterminer les coordonnées de chaque spot de la puce. Cette étape est normalement effectuée à l'aide d'une grille théorique définie lors du plan de dépôt des sondes. Pour localiser un spot sur une image, c'est-à-dire correspondre un modèle idéal de puce avec une image acquise, un nombre important de paramètres doit être estimé (espaces entre les spots, espaces entre blocs d'une puce...). De même que la précision du spotter.

Le repérage des spots doit être simple et rapide à réaliser. L'automatisation de cette tâche permet une accélération considérable de l'analyse.

Enfin, la définition des grilles doit être aussi juste que possible. En effet, la précision de cette étape dépend de l'efficacité des mesures ultérieures.

### ➤ **La segmentation des spots :**

Il s'agit ici de classer des pixels de l'image en deux classes : « fond » et « signal ». Ceci sous-tend une analyse du signal au niveau de chaque spot et un découpage de l'image en différentes régions. Chacune ayant des propriétés propres. En raison des propriétés biologiques des dépôts et de la physique de la chaîne d'acquisition, le bruit est acquis est fortement non uniforme dans l'image et varie en fonction d'un certain nombre de paramètres. De plus, à ce stade de l'analyse, la taille variable, la forme complexe et les irrégularités des spots compliquent la tâche de segmentation, mais doivent cependant être déterminés de manière semi-automatique voire automatique.

### ➤ **L'extraction des indices :**

Maintenant que les pixels « signal » sont identifiés, il s'agit d'extraire un ou plusieurs indices pertinents permettant de quantifier le niveau d'expression de chaque gène. Ce niveau correspond à une mesure relative des intensités de fluorescences en rouge et vert. Un filtrage des données permet de sélectionner des variations significatives (tri des spots sur un barème de critères), à partir desquelles un rapport de fluorescence est calculé. La valeur de ce ratio indique l'induction ou la répression du gène.

Dans le cas de la comparaison de données issues de plusieurs expériences (données temporelles, sain/pathologique...), il faut de plus nécessairement normaliser les données avant quantification pour éliminer les artefacts dus par exemple au protocole expérimental.

### ➤ **La classification des données :**

Enfin, les données préparées par les étapes précédentes permettent de regrouper les gènes par familles ayant des comportements semblables, en analysant les niveaux d'expression puis en classant les gènes de proche en proche (technique pairwise) ou en faisant appel à des techniques plus sophistiquées tel que l'analyse de la composante principale ou des réseaux neuronaux. La représentation des résultats se fait par clustering sous forme d'une barre verticale où chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne correspond à un gène. Les ratios vert/rouge sont représentés par une échelle à couleur.

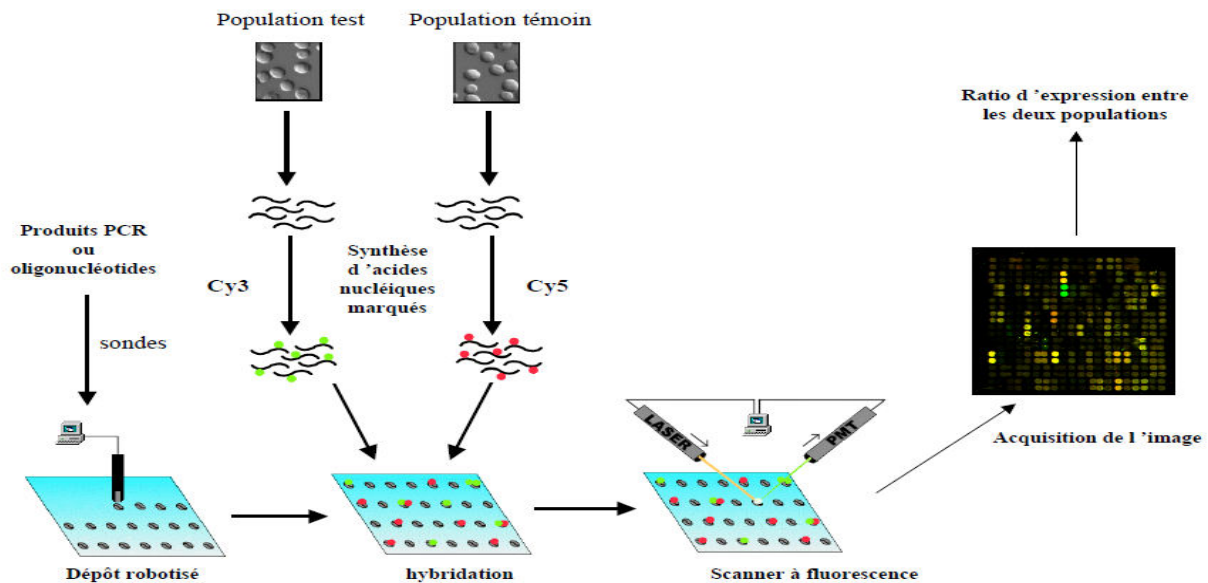


Figure n°15 : Principe générale des puces à ADN. (Eisen et Brown, *Methods in Enzymology* 1999)

### I. 1. 6. Exemples d'application des puces à ADN :

Le cancer du sein est le second cancer le plus fréquent, avec une incidence de 1 million de nouveaux cas par an dans le monde (OMS 2003). De nombreuses équipes ont utilisé les méthodes d'analyse du transcriptome pour essayer de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et en améliorer les stratégies thérapeutiques.

Les premières études ont permis de confirmer l'importance du statut des récepteurs d'oestrogène (ER) et l'hétérogénéité moléculaire de cette pathologie, en regroupant les tumeurs en plusieurs groupes : les *basal-like* (principalement ER négatives) et les *luminal-like* (principalement ER positives), dont le profil d'expression inclut respectivement de nombreux marqueurs des cellules myo-épithéliales (dites basales), ou des cellules luminales, et les *erbB2* (HER2) positives surexprimant cet oncogène.

En 2003, une équipe hollandaise a identifié, à partir de tumeurs malignes primaires du sein, une signature moléculaire de 70 gènes capable d'identifier une sous-population de patientes susceptibles de rechuter ou de développer des métastases avant 5 ans. Cette signature était indépendante des autres paramètres cliniques et prédirait un mauvais pronostic de façon plus performante que les critères clinico-pathologiques usuels.

Cette signature a été validée dans une population indépendante issue de plusieurs pays et va bientôt faire l'objet d'une large étude clinique prospective randomisée appelée MINDACT (Microarray for Node Negative Disease May Avoid Chemotherapy) où la prescription de chimiothérapie adjuvante sera décidée en fonction de cette signature moléculaire. Cette étude est la première à impliquer directement une méthode de puces à ADN dans la prise en charge clinique de patients. (J.-M. BIDART et al ; 2007).

## **I. 2. Le logiciel R :**

R est un système créé par Ross Ihaka et Robert Gentleman. Il comporte de nombreuses fonctions pour les analyses statistiques et les graphiques ; ceux-ci sont visualisés immédiatement dans une fenêtre propre et peuvent être exportés sous divers formats (jpg, png, bmp, ps, pdf, emf, pictex, xfig ; les formats disponibles peuvent dépendre du système d'exploitation).

Les résultats des analyses statistiques sont affichés à l'écran, certains résultats partiels (valeurs de P, coefficients de régression, résidus, . . .) peuvent être sauveés à part, exportées dans un fichier ou utilisées dans des analyses ultérieures (Emmanuel Paradis ; 2005).

## **I. 3. MeV :**

MeV (MultiExperiment Viewer ; <http://www.tm4.org/mev.html>) permet de faire l'analyse des données filtrées et normalisées. Il permet, entre autre, de faire la visualisation des hybridations et de leurs patrons d'expressions correspondantes. De nombreux algorithmes de 'clustering' (Bootstrapping, Jackknifing et K-means par exemple) sont disponibles pour identifier et travailler facilement avec des gènes d'intérêts.

Il est aussi possible d'ajouter des annotations personnelles ou publiques aux données d'expression à l'aide des fichiers EASE. MeV permet la mise en place et l'échange de protocole d'analyse sous forme de fichier facilement échangeable et utilisable.

Il est intéressant de préciser que MeV accepte beaucoup de format de fichiers comme fichier d'entrée donc il n'est pas nécessaire, bien que souvent recommandé, de faire la normalisation et standardisation des données avec MIDAS (possède une interface Java qui permet aux utilisateurs de construire des protocoles d'analyses combinant un ou plusieurs étapes de normalisation et de filtrage) avant de faire l'analyse avec MEV.

Il accepte les fichiers en format TIGR MeV (\*.mev), les fichiers délimités par des tabulations (\*.TDMS), les fichiers TIGR Array viewer (\*.tav), les formats Affymetrix, Genepix et Agilent.

#### **I. 4 DAVID :**

*D*atatabase for *A*nnotation, *v*isualization and *I*ntegrated *D*iscovery (Denis et al.; 2003. Hang and al.; 2009) regroupe un ensemble d'outils web destinés à l'annotation fonctionnelle d'ensemble de gènes à l'aide de sa propre banque de données, DAVID knowledgebase. Cette dernière intègre les identifiants de gènes ou de protéines de plusieurs espèces, ainsi que leur annotation, à partir d'une grande variété de banque de données publiques ( NCBI, PIR, SWISS-PROT, GO, OMIM, Pub-Med, KEGG, BIOCARTA, AffyMetrix, TIGR, Pfam, BIND, MINT, DIP...).

Les outils fournis par DAVID analysent des listes de gènes fournies par l'utilisateur et sont disponibles à l'adresse ([david.abcc.ncifcrf.gov/](http://david.abcc.ncifcrf.gov/)). Ils comprennent l'outil d'annotation fonctionnelle (analyse de l'enrichissement en catégories fonctionnelles, cartographie sur les voies métaboliques, résumé d'annotation sous forme de graphiques...), l'outil de classification fonctionnelle de gènes (regroupement gènes ayant une annotation fonctionnelle similaire et l'outil de conversion d'identifiants. Dans notre étude nous avons utilisé l'outil de classification fonctionnelle dans nos listes de gènes.

## II. METHODES

### II. 1. Objectif de l'étude :

Afin d'étudier les mécanismes d'adaptation de *P. aeruginosa*, notre étude s'est portée sur l'analyse de l'évolution de l'expression génique de la bactérie chez un patient atteint de FC sur une durée de 47 ans. En effet, une étude sur une longue durée permet de mieux observer les changements qui s'opèrent pour l'établissement de la chronicité et travailler sur le même patient nous évite les différences liés à la souche contaminatrice ainsi que celles inhérentes à la l'antibiothérapie suivie par le patient.

### II. 2. Présentation des données :

Notre travail a pris pour support des échantillons de *Pseudomonas aeruginosa* prélevés sur un patient atteint de fibrose kystique dans le laboratoire de bactériovirologie et hygiène dirigé par le Pr Didier Raoult à l'hôpital de la Timone à Marseille. Le sujet est un homme né en 1967 qui a été diagnostiqué positif pour la mucoviscidose à l'âge de 6 ans. On dispose de 3 échantillons réparti sur 3 dates avec 3 répliquas à chaque date. Les deux premiers échantillons ont été réalisés en 1973 puis 1992. Le dernier échantillon s'est fait en 2008 (figure n°16).

Les cellules récoltées ont été conservées à une température de -80°C puis décongelées pour que la totalité des ARN soit extraite à l'aide d'un RNeasy Mini Kit (Qiagen) (annexe n°3) et mises immédiatement dans un conservateur d'ARN (Qiagen). Elle a été par la suite transcrite en ADNc en utilisant SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). La purification de l'ADNc synthétisé s'est faite avec Qiagen PCR Purification Kit et fragmenté par une DNase I (Promega). L'ADN fragmenté a été marqué à son extrémité 3' par un réactif de marquage (Affymetrix) et la terminal deoxynucleotidyl transferase (Promega).

L'ADNc marqué a été hybridé avec la souche PAO1 de *P. aeruginosa* sur une puce Affymetrix et coloré sur GeneChip Fluidics Station 450 (figure n°17). Les sondes ont finalement été scannées avec GeneChip Scanner 3000 (figure n°18). Les données brutes (fichiers de format .CEL) ont été obtenues avec Affymetrix GeneChip Operating System 1.4 puis prétraitées par Bioconductor en utilisant la méthode **RMA** (annexe n°3 pour les protocoles des kits utilisés).

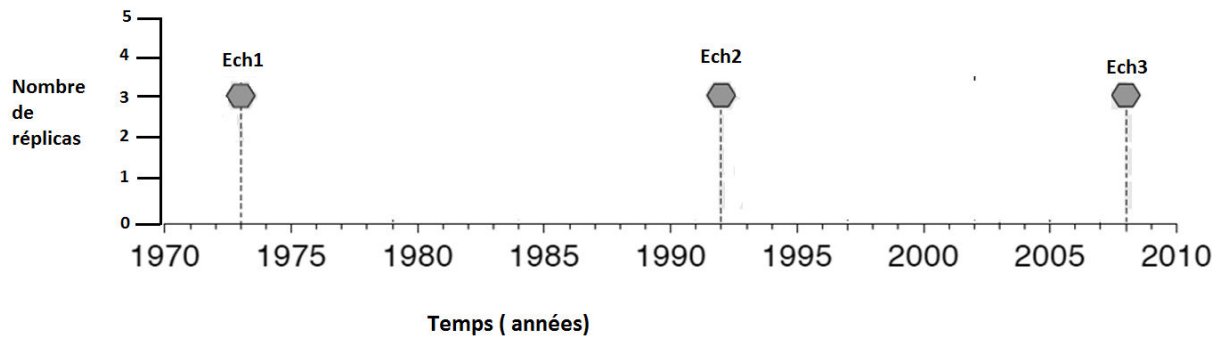


Figure n°16 : Représentation de la prise d'échantillon dans le temps.

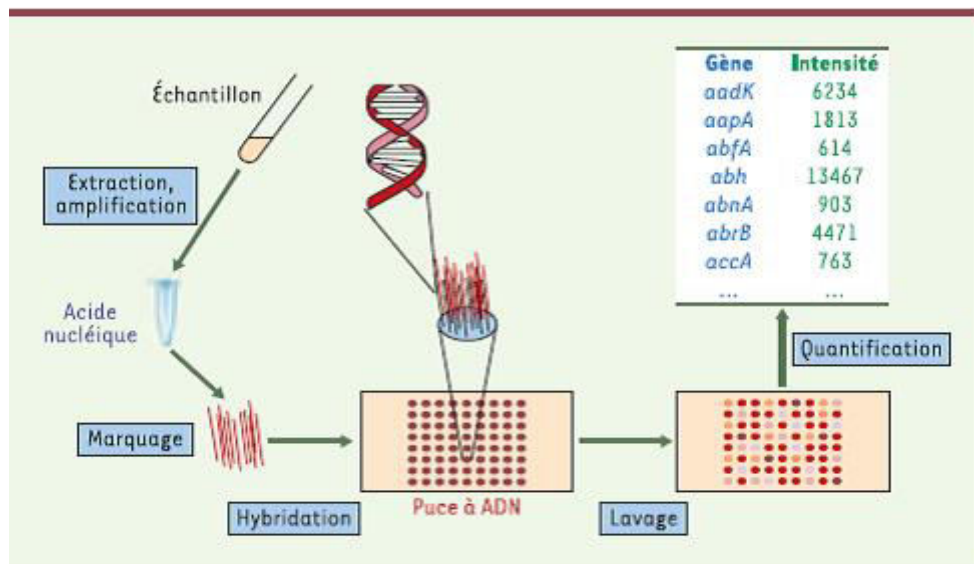
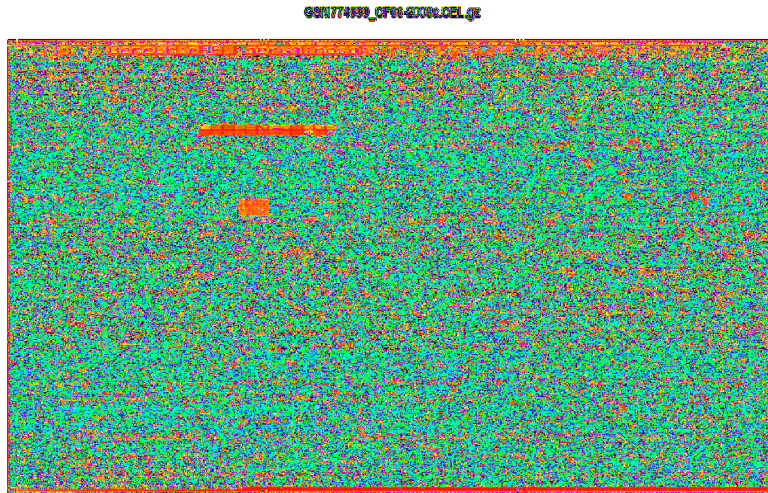


Figure n°17 : Analyse d'acides nucléiques par puce à ADN (Philippe Glaser ; 2005).



**Figure n°18 : Image d'une puce à ADN d'un échantillon pris en 2008 obtenue par la fonction *image()* de R.**

### II. 3. Prétraitement et normalisation des données avec le logiciel R :

La première étape de notre étude s'est faite avec le logiciel R ; à commencer par la visualisation des données brutes avec la fonction *arrayQualityMetrics()*, puis un prétraitement des données par la réalisation d'une normalisation avec la fonction *RMA ()* de la librairie (*Affy*).

On a ensuite réalisé avec ces données un tableau -avec les références d'échantillons comme noms de colonnes et les identifiants de gènes comme noms de lignes- sur lequel on a pu calculer la moyenne d'expression (M) de chaque gène à part dans tous les échantillons avec la fonction *mean()*. Le tableau contenait 5900 gènes (lignes) et 9 colonnes (3 prises × 3 répliques) (figure n°19).



```

Welcome to Bioconductor

Vignettes contain introductory material. To view, type
'browseVignettes()'. To cite Bioconductor, see
'citation("Biobase")' and for packages 'citation("pkgname")'.

> df = ReadAffy()
Erreur dans AllButCelsForReadAffy(..., filenames = filenames, widget = widget, :
No cel filenames specified and no cel files in specified directory:C:/Users/HASSAIRI/Rym
> df = ReadAffy()
> df
Loading required package: AnnotationDbi

AffyBatch object
size of arrays=403x403 features (12 kb)
cdf=Pae_G1a (5900 affyids)
number of samples=9
number of genes=5900
annotation=paeg1a
notes=
Message d'avis :
package 'AnnotationDbi' was built under R version 2.14.2
> set = rma(df)
Background correcting
Normalizing
Calculating Expression
> sett=data.frame(set)
> sett = t(as.matrix(sett))
> sett= sett[-nrow(sett),]
> head(sett)
      GSM774091_Cf66-1973a.CEL GSM774092_Cf66-1973b.CEL GSM774093_Cf66-1973c.CEL GSM774094_Cf66-1992a.CEL GSM774095_Cf66-1992b.CEL GSM774096_Cf66-1992c.CEL
AFFX.Athal_actin_at      5.186594          5.161083          5.170564          5.171267          5.242142          5.204789
AFFX.Athal_GAPDH_at      5.251996          5.158114          5.166023          5.153927          5.190881          5.160589
AFFX.Athal_ubq_at        5.235229          5.222599          5.225054          5.230037          5.299544          5.258782
AFFX.Bsubtilis_dapB_at   5.287578          5.229695          5.230328          5.210502          5.257887          5.255884
AFFX.Bsubtilis_lys_at    5.226458          5.163520          5.169240          5.168622          5.194751          5.211008
AFFX.Bsubtilis_pheB_at   5.411056          5.270067          5.300689          5.271544          5.290972          5.304688
      GSM774097_Cf66-2008a.CEL GSM774098_Cf66-2008b.CEL.gz GSM774099_Cf66-2008c.CEL.gz
AFFX.Athal_actin_at      5.163946          5.161282          5.157478
AFFX.Athal_GAPDH_at      5.146751          5.143959          5.153920
AFFX.Athal_ubq_at        5.242381          5.215932          5.217321
AFFX.Bsubtilis_dapB_at   5.226742          5.207547          5.199985
AFFX.Bsubtilis_lys_at    5.164831          5.138185          5.118537
AFFX.Bsubtilis_pheB_at   5.268611          5.255459          5.217663
> |

```

l'expression des six premiers gènes dans les neufs réplikas après la normalisation



**Figure n°19 : Tableau des expressions génique obtenues par R.**

L'étape suivante était le calcul des taux d'expression relative pour chaque gène. Les taux d'expression relative se calculs en divisant -pour chaque gène- une à une ses valeurs d'expression par leur moyenne générale (M). Cette fonction nous permet d'ajuster les valeurs sur une courbe Gaussienne et de ce fait repérer les valeurs hors de l'intervalle de confiance, ce qui représente une expression génique réprimée ou activée. Les résultats on étaient traduits en boxplot grâce à la fonction *boxplot()*.

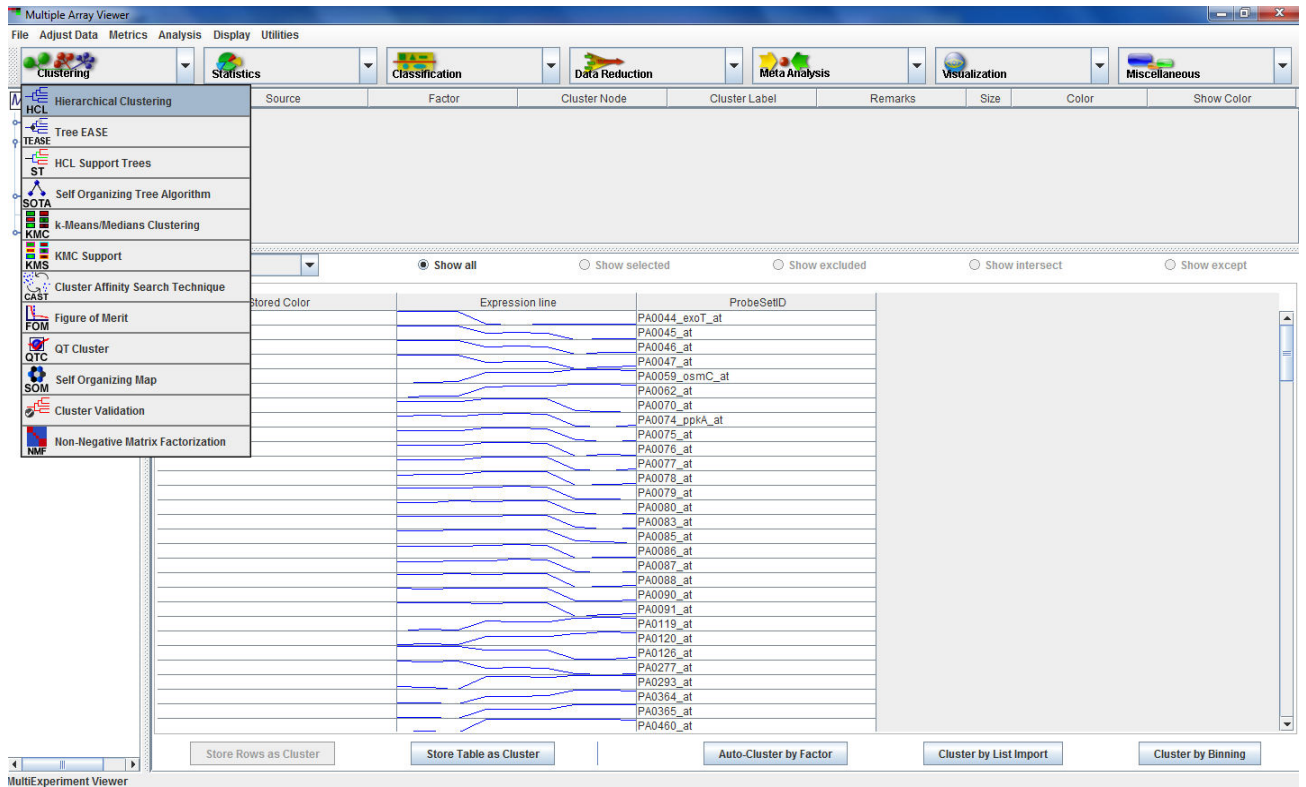
Le deuxième volet visait une comparaison entre les différentes expressions dans tous les échantillons et pour tous les gènes. Pour ce faire, il a fallu faire appel à la librairie (*limma*) qui contient des fonctions pouvant détecter les gènes différentiellement exprimés.

Quatre étapes précédaient la comparaison : (i) établissement d'une matrice contenant le nombre d'échantillons et le nombre de répliques pour chacun (ex : 1,1,1,2,2,2,3,3,3 ; ce qui veut dire 3 échantillons ou prises avec 3 répliques à chaque prise), (ii) nommer chaque échantillon (ex : A, B,C...), (iii) préciser toutes les combinaisons de comparaison possibles entre les échantillons (ex :A-B, A-C, B-C), (iiii) réaliser un alignement des données avec la fonction *lmFit()* pour enfin établir les comparaisons une à une par le biais de la fonction *eBayes()*.

Une fois la comparaison établie, on a organisé les gènes selon un ordre croissant de P-value, et donc les gènes en haut du classement sont ceux qui ont les meilleures probabilités d'être différentiellement exprimés (annexe n°1). Se basant sur ce raisonnement on a sélectionné les 200 gènes les mieux classés dont on a récupéré les valeurs d'expression avec lesquelles on va continuer notre étude avec le logiciel TMeV.

## **II. 4. Clustering et identification des signatures spécifiques de l'activation et la répression :**

L'utilisation du logiciel a nécessité le chargement du tableau issu du prétraitement avec R. En lui fournissant ces données sous format de fichier.txt Mev a pu réaliser, avec sa fonction Hierarchical Clustering (figure n° 20), un clustering des 200 gènes en utilisant le paramètre Spearman Rank pour la corrélation (un coefficient de corrélation dont les données sont transformées en rang, ce qui convient parfaitement à une étude de valeurs correspondant à une évolution). On a obtenu trois clusters (groupes) pour les 3 prises ou expériences.



**Figure n°20 : Interface du logiciel MultiExperiment Viewer.**

La deuxième utilisation de MeV était pour diviser les 200 gènes en deux clusters (groupes) : Up et Down, ce qui veut dire respectivement activés et réprimés. Pour ce, MeV met à la disposition de l'utilisateur une fonction nommée K-means/Medians Clustering. Pour le même paramètre de corrélation, on a sélectionné un calcul de K-means et défini le nombre de cluster à « 2 » (figure n°21). Des graphes d'expressions ont été automatiquement tracés pour les deux groupes isolés.

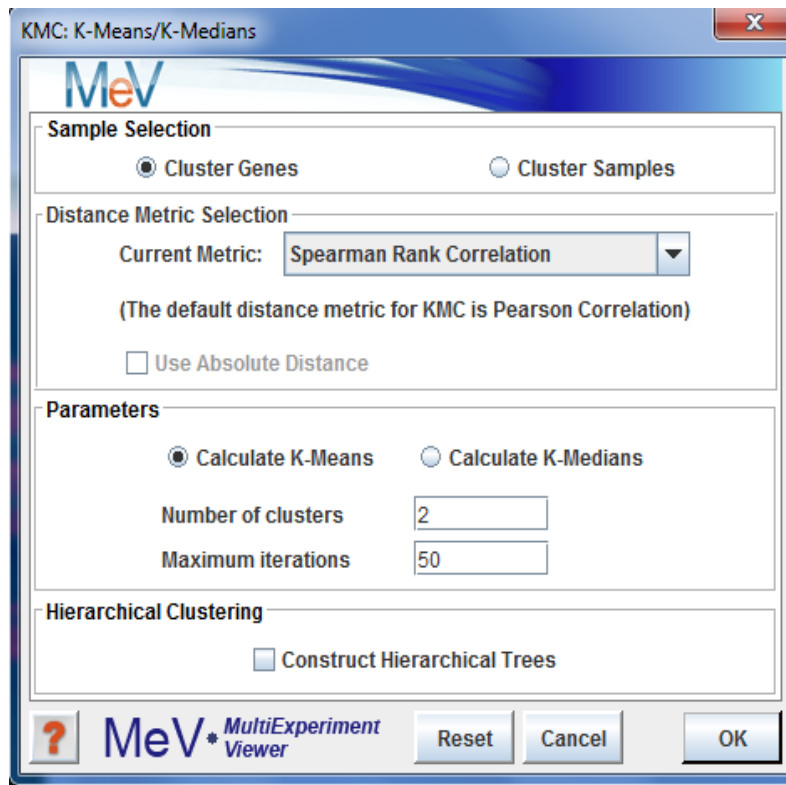


Figure n°21 : Paramétrage du clustering sur MeV.

Après isolement des deux clusters, MeV fournit les listes de gènes pour les deux groupes, qu'on a gardé pour une utilisation ultérieure avec DAVID. La liste des gènes réprimés contenait 117 gènes, alors la deuxième contenait 83 gènes sur les 200 gènes présélectionnés.

## II. 5. Annotation fonctionnelle et définitions des voies de signalisations avec DAVID :

L'utilisation des outils bioinformatiques de la base de données DAVID est possible grâce à une interface web ouverte au publique. Pour bénéficier des services d'annotation fonctionnelle proposés par le cite, nous avons dû soumettre, dans l'espace alloué à ce fait, l'une après l'autre, les deux listes de gènes qu'on avait obtenu au préalable de MeV.

Il a fallu aussi paramétrer l'analyse en précisant le type d'identifiant de nos gènes qui était « AFFYMETRIX\_3PRIME\_IVT\_ID », puis identifier nos listes comme étant « gene list »(figure n°22). La deuxième étape consistait en une sélection d'un outil d'analyse parmi la panoplie proposée dans le site (figure n°23).

The screenshot shows the DAVID Analysis Wizard interface. At the top, there is a red banner: "\*\*\* Announcing the new DAVID Web Service which allows access to DAVID from various programming languages. [More info...](#) \*\*\*". Below this, the page is titled "Analysis Wizard" and has a navigation menu with "Upload" and "List Background".

The main content area is divided into two columns. The left column contains the "Upload Gene List" section, which includes links for "Demolist 1", "Demolist 2", and "Upload Help". It is divided into four steps:

- Step 1: Enter Gene List**: "A: Paste a list" with a text input field and a "Clear" button. "Or B: Choose From a File" with a file selection button and a "Parcourir..." button. A checkbox for "Multi-List File" is also present.
- Step 2: Select Identifier**: A dropdown menu currently showing "AFFYMETRIX\_3PRIME\_IVT\_ID".
- Step 3: List Type**: Radio buttons for "Gene List" (selected) and "Background".
- Step 4: Submit List**: A "Submit List" button.

The right column contains instructions and an example list of gene IDs:

- "Step 1. Submit your gene list through left panel." with a blue arrow pointing left.
- "An example:" followed by the instruction: "Copy/paste IDs to 'box A' -> Select Identifier as 'Affy\_ID' -> List Type as 'Gene List' -> Click 'Submit' button".
- A list of gene IDs: 1007\_s\_at, 1055\_at, 117\_at, 121\_at, 1255\_g\_at, 1294\_at, 1316\_at, 1320\_at, 1405\_i\_at, 1421\_at, 1438\_at, 1487\_at, 1494\_f\_at, 1598\_g\_at.
- Annotations with green arrows pointing to the interface: "Sélectionner la liste de gènes à analyser" points to the list of IDs; "Définir le type d'identifiant des gènes" points to the dropdown menu; "Préciser le type de liste fourni" points to the radio buttons; "Soumettre la liste à l'analyse" points to the "Submit List" button.

At the top right of the right column, there are links: "Tell us how you like the tool" and "Contact us for questions".

Figure n°22 : Première étape avec DAVID : chargement de la liste à analyser.

\*\*\* Announcing the new DAVID Web Service which allows access to DAVID from various programming languages. [More info...](#) \*\*\*

## Analysis Wizard

[Tell us how you like the tool](#)  
[Contact us for questions](#)

**Upload** [List](#)  
**Background**

**Gene List Manager**

Select to limit annotations by one or more species [Help](#)

- Use All Species -  
Pseudomonas aeruginosa  
Unknown(1)

Select Species

**List Manager** [Help](#)

top200

Select List to:

Use Rename  
Remove Combine

Show Gene List

[View Unmapped Ids](#)

Step 1. Successfully submitted gene list  
Current Gene List: top200  
Current Background: Pseudomonas aeruginosa

Step 2. Analyze above gene list with one of DAVID tools

[Which DAVID tools to use?](#)

↻ [Functional Annotation Tool](#)

- [Functional Annotation Clustering](#)
- [Functional Annotation Chart](#)
- [Functional Annotation Table](#)

↻ [Gene Functional Classification Tool](#)

↻ [Gene ID Conversion Tool](#)

↻ [Gene Name Batch Viewer](#)

Sélection de l'outil DAVID adéquat pour l'analyse

daavid.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp

Figure n°23 : Deuxième étape de DAVID : le choix de l'outil d'analyse.

L'analyse nous a fourni pour les deux listes, un ensemble de voies de signalisation avec les P-values qui leur sont assignées ainsi que le nombre de gènes inclus dans chacune des voies sous forme de tableaux (figure n° 24 et 25).

\*\*\* Announcing the new DAVID Web Service which allows access to DAVID from various programming languages. [More info.](#) \*\*\*

### Functional Annotation Clustering

[Help and Manual](#)

Current Gene List: List\_1  
 Current Background: Pseudomonas aeruginosa  
 115 DAVID IDs

Options    Classification Stringency: Medium ▼  
   

#### 10 Cluster(s)

[Download File](#)

Annotation Cluster	Enrichment Score			Count	P_Value	Benjamini
<b>Annotation Cluster 1</b> Enrichment Score: 7.48						
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Bacterial secretion system</a>	RT		19	1.0E-20	3.8E-19
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Bacterial secretion system</a>	RT		11	1.7E-8	3.2E-7
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Bacterial secretion system</a>	RT		10	6.9E-8	8.5E-7
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein secretion</a>	RT		11	1.1E-6	6.8E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">secretion by cell</a>	RT		11	1.1E-6	6.8E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">secretion</a>	RT		11	1.1E-6	6.8E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein transport</a>	RT		12	2.1E-6	8.5E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">establishment of protein localization</a>	RT		12	2.1E-6	8.5E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein localization</a>	RT		12	2.4E-6	7.4E-5
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein secretion by the type III secretion system</a>	RT		4	1.1E-5	2.3E-4
<b>Annotation Cluster 2</b> Enrichment Score: 4.94						
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of secretion</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of protein secretion</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of protein transport</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cellular localization</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of establishment of protein localization</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of protein localization</a>	RT		4	6.3E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/> INTERPRO	<a href="#">Tir chaperone</a>	RT		3	4.0E-4	7.3E-2
<b>Annotation Cluster 3</b> Enrichment Score: 3.94						
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	RT		7	3.9E-7	3.6E-6
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	RT		4	1.8E-3	1.3E-2
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	RT		4	2.2E-3	1.4E-2
<b>Annotation Cluster 4</b> Enrichment Score: 2.96						
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	RT		7	3.9E-7	3.6E-6

Figure n°24: Voies de signalisation régulées à la baisse par DAVID.

\*\*\* Announcing the new DAVID Web Service which allows access to DAVID from various programming languages. [More info..](#)

\*\*\*

## Functional Annotation Clustering

[Help and Manual](#)

Current Gene List: List\_1

Current Background: Pseudomonas aeruginosa

83 DAVID IDs

Options Classification Stringency Medium

Rerun using options

Create Sublist

### 12 Cluster(s)

[Download File](#)

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 9.21				Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	RT			17	1.3E-19	1.5E-17
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	RT			10	4.6E-10	2.6E-8
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	RT			9	1.4E-7	5.4E-6
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Propanoate metabolism</a>	RT			8	1.7E-6	3.9E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	RT			7	6.2E-6	1.2E-4
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 3.59				Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT			8	5.6E-7	1.6E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	RT			7	6.2E-6	1.2E-4
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">fatty acid metabolism</a>	RT			3	5.3E-5	3.1E-3
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">lipid metabolism</a>	RT			3	1.1E-4	2.1E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT			5	2.8E-4	2.6E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT			4	4.9E-3	3.6E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT			4	1.2E-2	7.7E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">fatty acid metabolic process</a>	RT			3	5.6E-2	5.4E-1
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 2.77				Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT			8	5.6E-7	1.6E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Propanoate metabolism</a>	RT			8	1.7E-6	3.9E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Lysine degradation</a>	RT			6	1.7E-5	2.7E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Butanoate metabolism</a>	RT			7	3.2E-5	4.4E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tryptophan metabolism</a>	RT			6	7.2E-5	8.9E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Synthesis and degradation of ketone bodies</a>	RT			4	1.6E-4	1.8E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Geraniol degradation</a>	RT			5	1.9E-4	1.9E-3

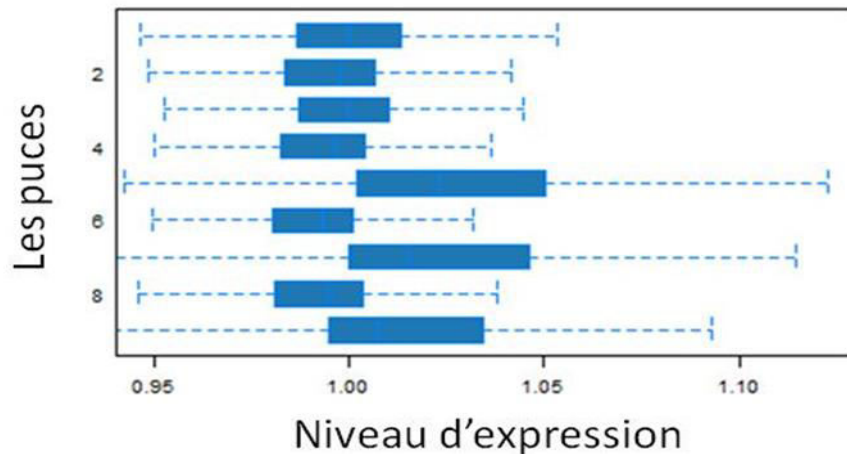
Figure n°25 : Voies de signalisation régulées à la hausse par DAVID.



## *Résultats*

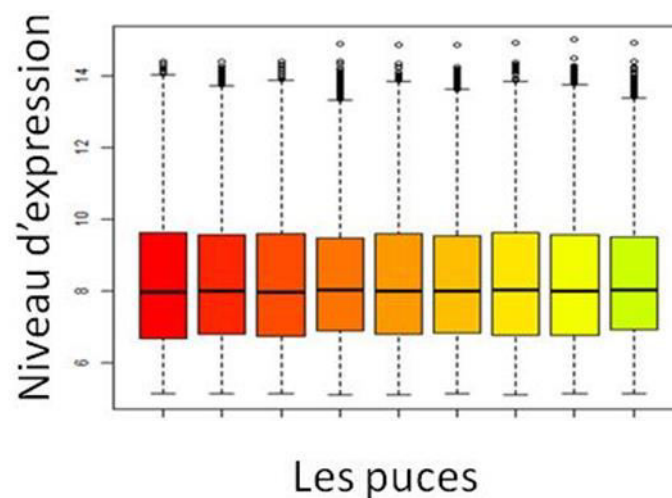
➤ **Les résultats de R :**

R est un langage de développement bioinformatique contenant un nombre très important de fonctions mathématiques et statistiques. Ces fonctions sont contenues dans des packages qui eux même font partie des bibliothèques. Elles sont mises à disposition sous forme d'un logiciel et utilisables par le biais d'une console. Cet outil nous a permis de faire visualiser –avant tout traitement- les données de nos puces à ADN qu'il a traduit en boxplots (figure n°26).



**Figure n°26 : Boxplots des données brutes.**

la deuxième fonction que nous avons utilisé était la fonction **RMA()**, c'est une fonction de normalisation, qui nous a permis de faire un ajustement des données afin de minimiser les écarts non significatifs (erreurs de manipulation, bruits de fonds...). Une deuxième visualisation des données en boxplots matérialise l'efficacité de cette fonction (figure n° 27).



**Figure n°27 : Boxplots des données après la normalisation RMA.**

Les statistiques sont le fondement de chaque étude bioinformatique. La figure suivante est issue de la transformation des données en une courbe en cloche grâce au calcul des expressions relatives.

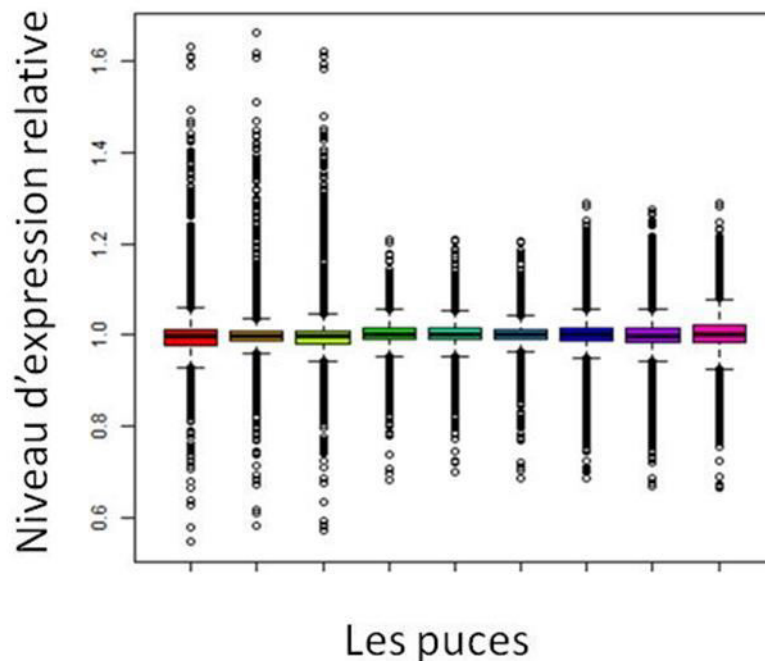


Figure n°28 : Boxplots des expressions relatives.

➤ **Les résultats de Mev :**

Le logiciel de visualisation Mev nous a fourni, après chargement de la liste des 200 gènes sélectionnés, un classement en 3 clusters correspondant aux 3 prises d'échantillons. L'expression génique est mise en valeur par coloration : rouge pour un gène exprimé, vert ou noir pour un gène réprimé ou moyennement exprimés (figure n°29).

La division des gènes présélectionnés en deux groupes Up et Down (exprimés et réprimés), a permis de tracer des graphes d'expression génique individuelle pour chaque groupe, puis un tracé jumelé pour une meilleure visualisation (annexe n°2 : figure 1, 2 et 3)

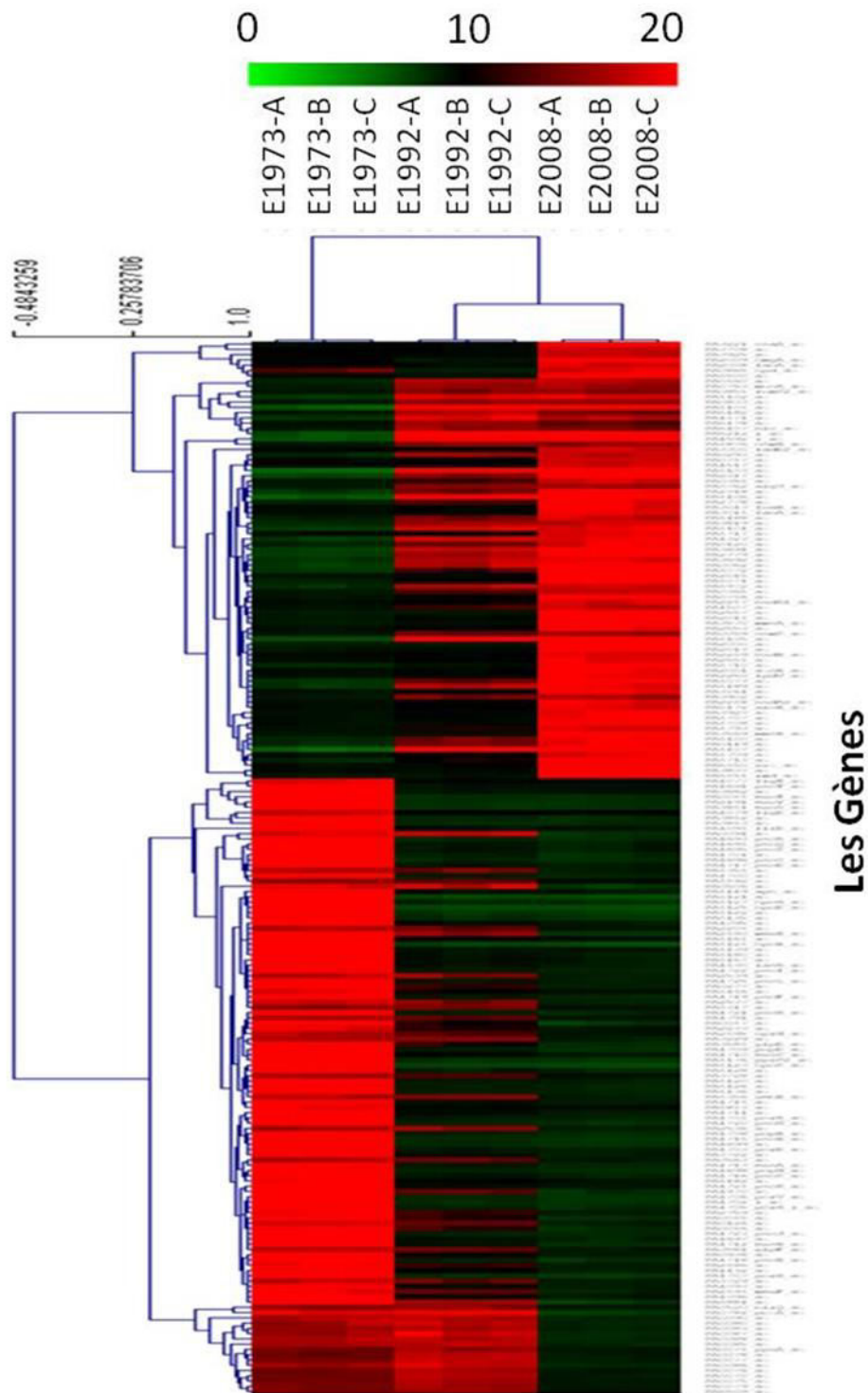


Figure n°29 : Clustering des 200 gènes sélectionnés par MeV.

➤ **Les résultats de DAVID :**

Après chargement de la liste des gènes ainsi que la définition des paramètres, DAVID nous a proposé un certain nombre de voies de signalisation caractérisées à chaque fois par un une P\_value et le nombre de gènes qui y sont impliqués.

Parmi les voies proposées, nous avons sélectionné les plus pertinentes et ayant les meilleurs P-values que nous avons mis dans le tableau suivant :

Type de régulation	Voies concernées	Nb de gènes impliqués	Exemples de gènes	P-Value
Up	Métabolisme de la valine, leucine and isoleucine	17	<ul style="list-style-type: none"> <li>mmsA : methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (degradation de la valine)</li> <li>mmsB : 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase</li> </ul>	1.3E-19
Up	Métabolisme des propanoates	8	<ul style="list-style-type: none"> <li>liuC : gamma-carboxygeranoyl-CoA hydratase</li> </ul>	1.7E-6
Up	Métabolisme des acides gras	8	<ul style="list-style-type: none"> <li>fadB : multifunctional fatty acid oxidation complex subunit alpha</li> <li>fadD2 : long-chain-fatty-acid--CoA ligase</li> </ul>	5.6E-7
Down	Systèmes de sécrétion bactérienne	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>ppKA : A kinase (PRKA) anchor protein 10</li> <li>pscJ : type III export protein</li> </ul>	8.4E-22
Down	Métabolisme de la tyrosine	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>hpcD : 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase</li> </ul>	5.5E-7
Down	Assemblage du flagelle	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>fliD : flagellar capping protein FliD</li> <li>flgB : flagellar basal body rod protein FlgB</li> </ul>	6.2E-3

**Tableau n°3 : Les voies de signalisation différenciellement exprimées.**

Up : régulation à la hausse ; Down : régulation à la baisse

Nb : Une schématisation des voies de signalisation fournie par la base de données KEGG est disponible en annexe (annexe n°2, figure 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9).

## *Discussion*

Comprendre l'adaptation bactérienne est un grand défi pour les scientifiques et les médecins dans la bataille qu'ils mènent contre les maladies infectieuses. Les cellules bactériennes ont un taux élevé de mutations et peuvent s'adapter à des environnements d'accueil dynamiques en sélectionnant des mutants qui sont plus aptes aux nouvelles conditions

Ainsi, une étude systématique de l'ensemble des profils d'expression génique des isolats cliniques serait nécessaire pour le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses. Heureusement, les progrès rapides des projets de séquençage de l'ADN ont fait que le génome de la plupart des bactéries pathogènes soit aujourd'hui connu. Ceci a fait de la technique des puces à ADN un outil d'investigation privilégié par les chercheurs. Cependant, la façon précise d'analyser les données des biopuces et d'en extraire les informations utiles reste un obstacle à surmonter.

L'objet de notre travail est l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu hostile que sont les voies respiratoires chez un patient atteint de mucoviscidose. La mucoviscidose ou la fibrose kystique est l'affection héréditaire la plus fréquente dans les populations d'origines caucasiennes (Munck et al ; 2005). Cette maladie à transmission autosomique récessive a pour origine, une ou plusieurs mutations dans le gène CF. ce gène de 180 000 bp, situé sur le bras long du chromosome 7, code pour une protéine nommée CTFR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

La glycoprotéine CTFR appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Rommens et al ; 1989). Elle se situe au niveau du pôle apical des cellules glandulaires exocrines et participe au maintien de l'équilibre hydroélectrolytique des sécrétions muqueuses en contrôlant l'excrétion des ions  $Cl^-$  (Anderson et al ; 1991).

Les cellules épithéliales des différentes glandes exocrines de l'organisme peuvent ainsi contrôler le transport transmembranaire de sels et d'eau. Ce type de sécrétion est indispensable à de nombreuses fonctions cellulaires telles que : le maintien d'un pH favorable pour l'action des enzymes digestives, le maintien d'un environnement salin pulmonaire, la maturation des spermatozoïdes, ou encore la formation des sécrétions sudoripares.

Dans le cas de la mucoviscidose, le transport d'électrolytes est perturbé par le disfonctionnement du canal CFTR et s'accompagne à des degrés divers de troubles obstructifs pulmonaires, d'insuffisance pancréatique, d'infertilité masculine et d'une sécrétion sudoripare anormalement concentrée en sels (Becq ; 2003).

Dans cette étude l'interprétation s'est faite en comparant pour chaque voie de signalisation, les taux d'expression génique entre les trois échantillons de *Pseudomonas aeruginosa*. Pris en 1973 puis 1992 et enfin 2008, les résultats représentent une évolution sur 47 ans de l'adaptation bactérienne.

Pour l'accomplissement de ce travail, notre fusil d'épaule a été d'abord les puces à ADN. Les puces à ADN sont des multicateurs permettant de caractériser et quantifier un acide nucléique dans un échantillon. Elles apportent une solution innovante au problème ancien de la détection, de l'identification et du typage de bactéries dans un échantillon. Elles permettent la caractérisation génomique rapide de bactéries pathogènes et facilitent les études épidémiologiques, par exemple pour le contrôle des maladies nosocomiales ou la surveillance du bioterrorisme.

En second lieu, les outils bioinformatique tel que le logiciel R, le logiciel Tmev (Transcriptome MultiExperiment Viewer) et DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) nous ont permis tour à tour de : (i) prétraiter et de normaliser les données brutes issues des puces à ADN (sous format de fichiers .CEL), puis (ii) isoler les gènes différentiellement exprimés et enfin (iii) l'annotation fonctionnelle nous a permis de sélectionner les voies de signalisations dont le changement de régulation serait pertinent pour l'adaptation de *P. aeruginosa*.

Nos résultats montrent une inhibition des systèmes sécrétoires bactériens, notamment le système de sécrétion de type III (le SST3). Responsable de la dissémination bactérienne et de l'injection de toxines dans les cellules de l'épithélium (Roy-Burman et al., 2001), ce système est actif dans la phase aigüe puis réprimé dans la phase chronique (Hauser et al., 2011).

Ce mécanisme apparaît tel un mécanisme d'invasion, ce qui correspondrait mieux avec la phase aigüe, alors que pour l'établissement de la chronicité, les cellules bactériennes ont tendance à s'organiser en communautés sessiles et former un biofilm (Costerton et al., 1999). Nous supposons que cette différence d'action pourrait expliquer l'inhibition de l'expression de ce système sécrétoire.



Parmi les gènes hautement exprimés dans les résultats obtenu par DAVID, nous retrouvons le catabolisme de la leucine de l'isoleucine et plus significativement, le catabolisme de la valine ; avec en contre parti une inhibition des gènes de dégradation de cette dernière. Une baisse d'expression des gènes codant pour le métabolisme de la tyrosine a également été observée.

Dans leur étude menée sur la dynamique d'adaptation de *P. aeruginosa*, Hoboth et al, supposent que l'activation de la biosynthèse de la valine, la leucine et de l'isoleucine est dû à la l'augmentation de la production des systèmes d'efflux tel que les ABC-transporters. Selon eux ces acides aminés rentreraient peut être dans la constitution de ces nouvelles protéines (Hoboth et al ; 2009).

Vu l'hostilité du milieu dans lequel se trouvait *P. aeruginosa* –lors de la prise d'échantillons- causée par les multiples réactions immunitaires ainsi que l'antibiothérapie, nous pensons que ce changement métabolique serait un mécanisme défensif de *P. aeruginosa*. Nous optons pour l'hypothèse selon laquelle les acides aminés dont l'expression a été régulée à la hausse, remplaceraient d'autres dont l'expression a été réprimée. Le changement s'opérerait au niveau des protéines et glycoprotéines ciblées par les antibiotiques. Ceci induirait un changement structural qui confèrerait une résistance à *P. aeruginosa* contre les antibiotiques dont les cibles ont été changées.

La caractéristique la plus importante de *P. aeruginosa* est sa flexibilité génétique et métabolique remarquable qui lui permet probablement de proliférer dans divers habitats, y compris l'hôte humain. Pendant la colonisation et l'infection de l'environnement sélectif des poumons de FC, la bactérie a besoin d'acquérir des éléments nutritifs pour une croissance à haute densité ainsi que la production d'énergie en concurrence avec les micro-organismes commensales et / ou les cellules de l'hôte. Pas étonnant que plusieurs études sur la caractérisation de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose indiquent que, pendant la résistance pulmonaire le métabolisme est une cible d'adaptation dominante (*Michael Hogardta et JürgenHeesemann ; 2010*)

Une étude menée par Hagins et al en 2009, a mis en évidence l'augmentation de la production de l'isocitrate lyase (ICL) codée par le gène *aceA* chez les isolats de *P. aeruginosa* de la FC. Ceci pointerait à la pertinence du shunt

glyoxylate qui est généralement utilisé pendant la croissance, sur les acides gras et de l'acétate en tant que source unique de carbone.

Ceci nous laisse supposer que l'activation du métabolisme des acides gras que nous avons retrouvé au cours de notre étude, rentre dans le cadre d'une adaptation nutritionnelle. Nous suggérons que *P. aeruginosa* opterait pour la dégradation des acides gras abondants dans les sécrétions pulmonaires des patients atteints de fibrose kystique.

Plusieurs chercheurs tels que Mahenthiralingam et al en 1994, ont mentionné dans leurs travaux, la perte de mobilité chez *P. aeruginosa* pendant la phase chronique. La perte de certaines fonctions comme la mobilité, l'antigène O, les protéases, les exotoxines et autres serait dû à une évolution sélective pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Smith et al ; 2006). En effet, le flagelle est reconnu par les récepteurs se trouvant à la surface des cellules de l'hôte, les Toll-like receptors. Ces récepteurs active la réponse immunitaire en induisant la phagocytose (Eyal Amiel et al. ; 2010) ou la production de cytokines tel que les TNF, IL-6 et IL-8. Il est aussi la cible de l'elastase des neutrophiles. Libérée dans le mucus des voies respiratoires, l'elastase dégrade le crochet flagellaire protéique à la surface bactérienne, la FlgE. Dès lors ; l'appareil flagellaire ne peut plus être exporté.

D'autre part, les cellules de la réponse immunitaire sécrètent un facteur anti-sigma nommé Flim qui s'accumule dans la bactérie et se lie à Flia. La séquestration du Flia empêche l'expression des gènes flagellaires normalement visées par cet activateur de la transcription, ce qui entraîne l'absence de flagelles.

Un mécanisme supplémentaire par lequel flagelles sont régulés à la baisse au cours de l'infection chronique est l'accumulation de mutations dans le gène fleQ lui-même (gène codant pour le flagelle) (Jeffrey L. Veessenmeyer et al ; 2009).

Dans notre travail, nous avons noté une inhibition de la production des protéines incluses dans l'assemblage du flagelle. Se basant sur l'étude de O'Toole and Kolter en 1998, selon laquelle les cellules bactériennes immobiles croîtraient en microcolonies suite à la différenciation du biofilm ; nous suggérons dans ce cas, que la synthèse du flagelle serait un fardeau énergétique inutile pour *P. aeruginosa*.

L'étude des mécanismes d'évolution de *P. aeruginosa* nous ouvre de nouvelles voies d'investigations dont l'exploration pourrait mener vers une thérapie plus adaptée de la mucoviscidose.

## Conclusion :

Avec une incidence généralement estimée à 1 sur 4600 naissances, la mucoviscidose (CF) est l'affection héréditaire la plus fréquente dans les populations d'origine caucasiennes. Du point de vue clinique, la mucoviscidose se caractérise par une perturbation des échanges hydro-électriques transmembranaire des cellules épithéliales des tissus exocrines, notamment des voies aériennes. La production d'un mucus visqueux qui en résulte favorise la colonisation bronchique par diverses espèces bactériennes, dont la plus significative sur le plan de la pathogénicité est *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie de l'environnement parvient à s'implanter chez les patients atteints de mucoviscidose et à aggraver la symptomatologie pulmonaire par son action pro-inflammatoire.

Le traitement de ce type d'infection-colonisation repose généralement sur l'utilisation d'antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines et les aminosides. Si l'éradication de la bactérie peut être obtenue aux premiers stades de la colonisation grâce à l'administration de l'antibiothérapie adaptée, elle devient pratiquement impossible lorsque l'infection a atteint un stade chronique.

Cette mauvaise efficacité thérapeutique résulte en partie des nombreux mécanismes de résistance développés par *Pseudomonas aeruginosa* chez le patient CF. Ainsi, cerner ces mécanismes d'adaptation qui permettent la pérennité de *P. aeruginosa* pour une meilleure thérapeutique était l'objet de notre étude.

Nos résultats sont issus de la comparaison du transcriptome de *P. aeruginosa* entre la phase aiguë et chronique de l'infection chez un patient CF et ce sur une période de 47 ans. L'analyse de ces résultats a montré une régulation à la baisse nettement significative de certains facteurs de virulence tels que le système de sécrétion bactérienne de type III ou le SST3 (responsable –essentiellement- de l'injection d'exotoxines dans les cellules épithéliales) et la production du flagelle (et donc la perte de la mobilité). D'autres métabolismes ont été par contre régulés à la hausse tels que : le métabolisme de la valine, le métabolisme des acides gras ou encore celui des propanoates.

Ces changements pourraient être à l'origine de la persistance de la bactérie par l'acquisition de la résistance dans un premier volet, contre les traitements administrés. En effet, l'intégration de nouveaux acides aminés -comme la valine- dans les structures protéiques induirait un changement des cibles qui ne seront plus reconnues par les antibiotiques.

En second lieu, l'acquisition de la résistance aux réponses du système immunitaire par la réduction des facteurs immunogènes comme les toxines ou le flagelle. Le troisième volet et non le moins important consiste dans les changements métaboliques qui on le suppose, sont le fruit d'une adaptation nutritionnelle qui constitue un élément majeur de la pérennité bactérienne.

Pour la caractérisation et l'identification des facteurs associés à l'adaptation et à l'évolution de la résistance des souches de *P. aeruginosa*, une étude comparative des profils d'expression génique de plusieurs isolats issus de différents patients pourrait tracer un prototype d'adaptation sur lequel de nouvelles thérapies seront ajustées. Une antibiothérapie ciblée pourrait être plus efficace notamment dans la phase chronique de l'infection.

## Annexe n°1 : le script de R :

```
mon script R.txt
1 ##### Début du script
2 > source("http://bioconductor.org/biocLite.R") ## définir la source des packages
3 > biocLite () ## charger le package bioclite
4 > biocLite("arrayQualityMetrics")
5 > biocLite("tKWidgets") ## définir les fonctions à utiliser
6 > setwd("C:/Utilisateurs/HASSAIRI/Rym/data") ## définir le chemin vers les fichiers .CEL
7
8
9 > library(affy) ## charger la librairie affymetrix
10 > library(limma) ## charger la librairie limma
11 > data = ReadAffy() ## lire tout les fichier .CEL et les sauves dans l'objet "data"
12 > data ## visualiser l'objet "data" sous form d'affy batch
13 > image(data , col=rainbow (n=225)) ## visualiser des images des puces à ADN
14 > arrayQualityMetrics(data,do.logtransform=TRUE,outdir="QM") ## visualiser les données brutes en graphes et boxplots
15 > norm = rma(data) ## réaliser une normalisation avec la fonction RMA
16 > head(norm) ## visualiser l'en-tête de l'affy batch après normalisation
17
18 > normtab=data.frame(norm) ## transformer le affy batch en tableau (data frame)
19 > normtab = t(as.matrix(normtab)) ## inverser le tableau (le paramètre "t" pour tableau/ l'option matrix désigne une organisation de : colonnes x lignes)
20 > normtab= normtab[-nrow(normtab),] ## supprimer la dernier ligne qui contient des informations inutiles
21 > head(normtab) ## visualiser le tableau
22 > dim(normtab) ## obtenir la taille du tableau (nb gène x nb expérience)
23
24
25 > boxplot(normtab , col=rainbow(n=40)) ## visualiser les données en boxplots après normalisation
26 (les boxplots sont en couleur avec l'option "col"/ n désigne le nombre de couleur utilisées)
27
28
29
30 > moy= apply(normtab, MAR=1 , mean) ## calculer la moyenne de l'expression de chaque gène à part (désigné par l'option MAR=1) dans toutes les expériences
31 > head(moy,3) ## visualiser les moyennes d'expression pour les 3 premiers gènes
32
33 > gauss= normtab/moy ## diviser les taux d'expression de chaque gène par leurs moyennes respectives pour avoir des taux relative d'epression
34
35 > boxplot(gauss , col=rainbow(n=40)) ## visualiser les taux d'expression relative en boxplots
36
37 > write.table(gauss, file = "matrix.txt", sep = "\t", row.names = FALSE, col.names = TRUE)
38 ## enregistrer ce tableau sur ordianteur dans un fichier texte sous le nom de "matrix"
39 avec une séparation "tabulation" entre les valeurs (sep = "\t")
40 seules les colonnes seront nommées dans le tableau(row.names = FALSE, col.names = TRUE)
41
42
43 > colnames(design) <- c("A","B","C") ## nommer les colonnes (chaque colonne correspond à un échantillon)
44
45
46 > design <- model.matrix(~ -1 + factor(c(1,1,1,2,2,2,3,3,3)))
47 ## crée une matrice en précisant le nombre d'échantillons (3 échantillons dans notre cas)
48 et le nombre de réplikat pour chaque échantillon (nous diposons de 3 réplikas pour chaque échantillon)
49
50 > contrast.matrix <- makeContrasts(A-B,A-C,B-C, levels=design)
51 ## définir toutes les coparaisons à faire entre tous les échantillons
52
53 > fit <- lmFit(gauss, design) ## ajuster les valeurs de chaque gène sur un modèle linéaire
54
55 > bay= eBayes(contrasts.fit(fit,contrast.matrix)) ## réaliser les comparaisons définies préalablement une à une
56
57 > baytri <- bay[order(bay$F.p.value, decreasing=FALSE),]
58 ## ordonner les gènes selon un ordre croissant de la P-value
59
60 > mGenes <- baytri$genes$ID[1:200] ## selectionner les 200 premiers gènes qui ont la plus grande probabilité (petite P-value)
61 d'avoir une différence d'expression génique significativement différente des autres
62
63
64 expGenes = subset(gauss, subset=row.names(gauss)%in% mGenes)
65 ## récupérer les valeurs d'expression de ces 200 gènes
66
67 write.table(x=cbind(row.names(expGenes),expGenes),file="top200.txt", sep='\t',row.names=FALSE)
68 ## créer un tableau avec les données récupérées et l'enregister dans un fichier texte nommé "top200"
69
70 ##### Fin du script
```

## Annexe n°2 : Les figures

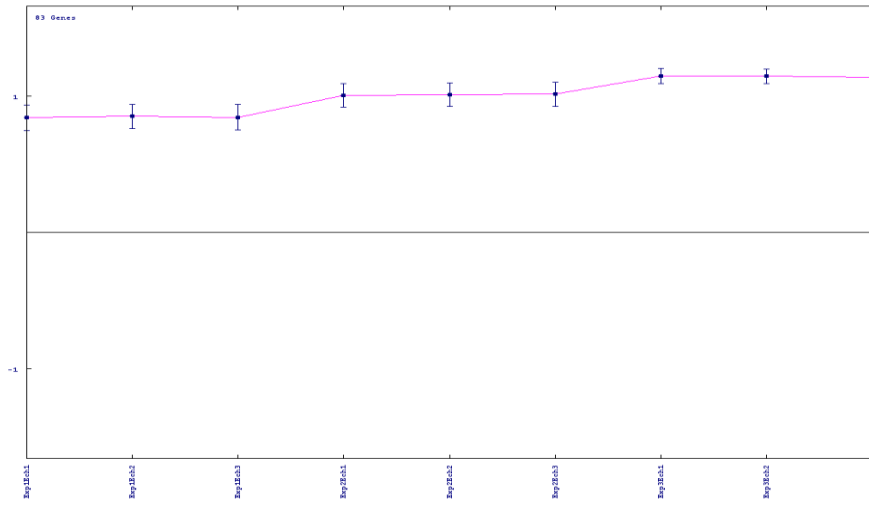


Figure n°1 : Tracé de l'expression génique des gènes activés par MeV

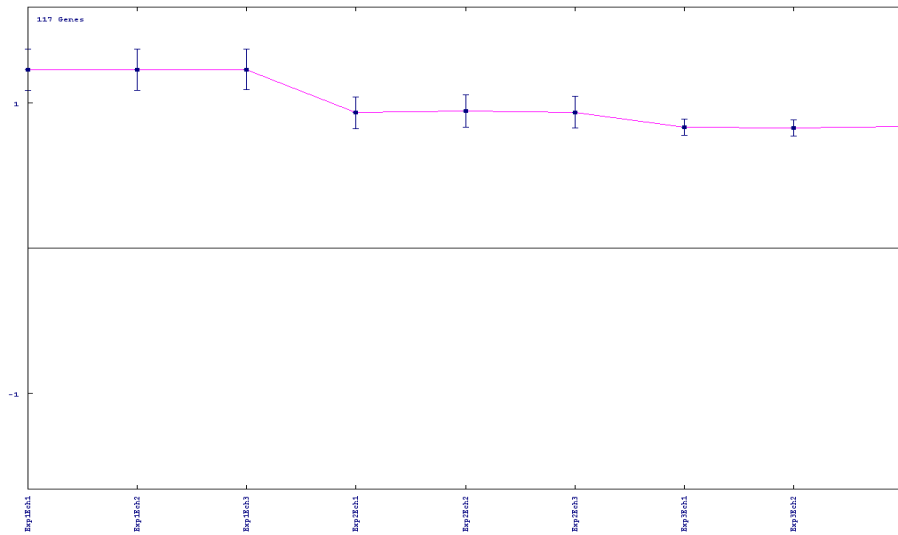


Figure n°2 : Tracé de l'expression génique des gènes réprimés par MeV

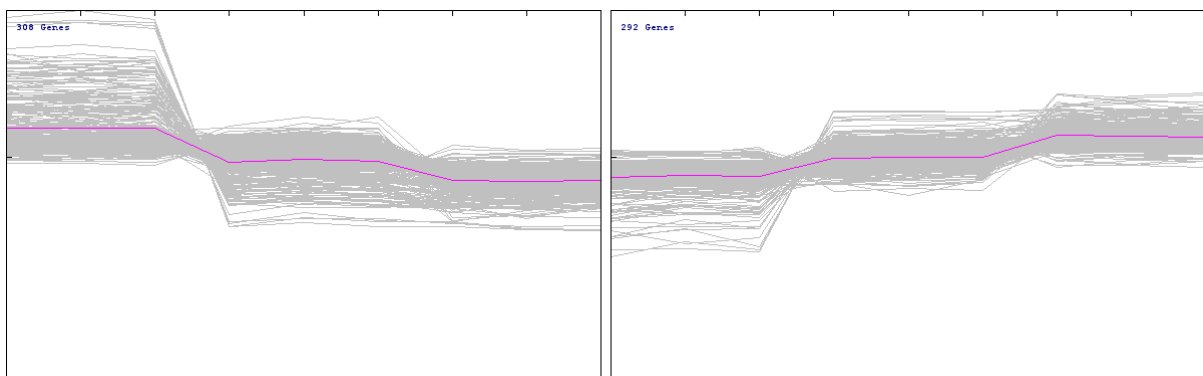


Figure n°3 : Représentation de l'évolution de l'expression génique

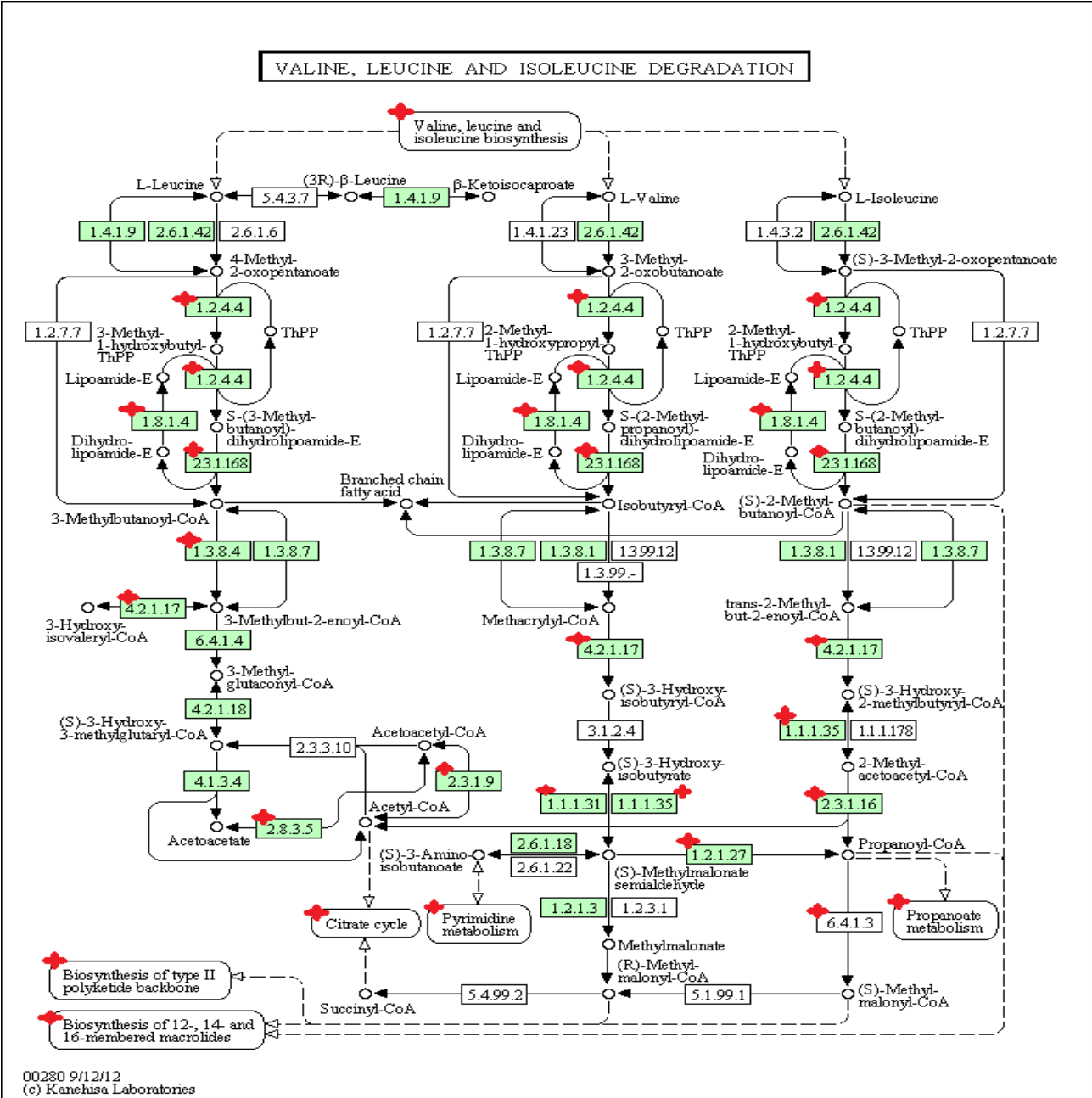


Figure n°4 : Les gènes activés dans le métabolisme de la valine, leucine et isoleucine (marqués en rouge).





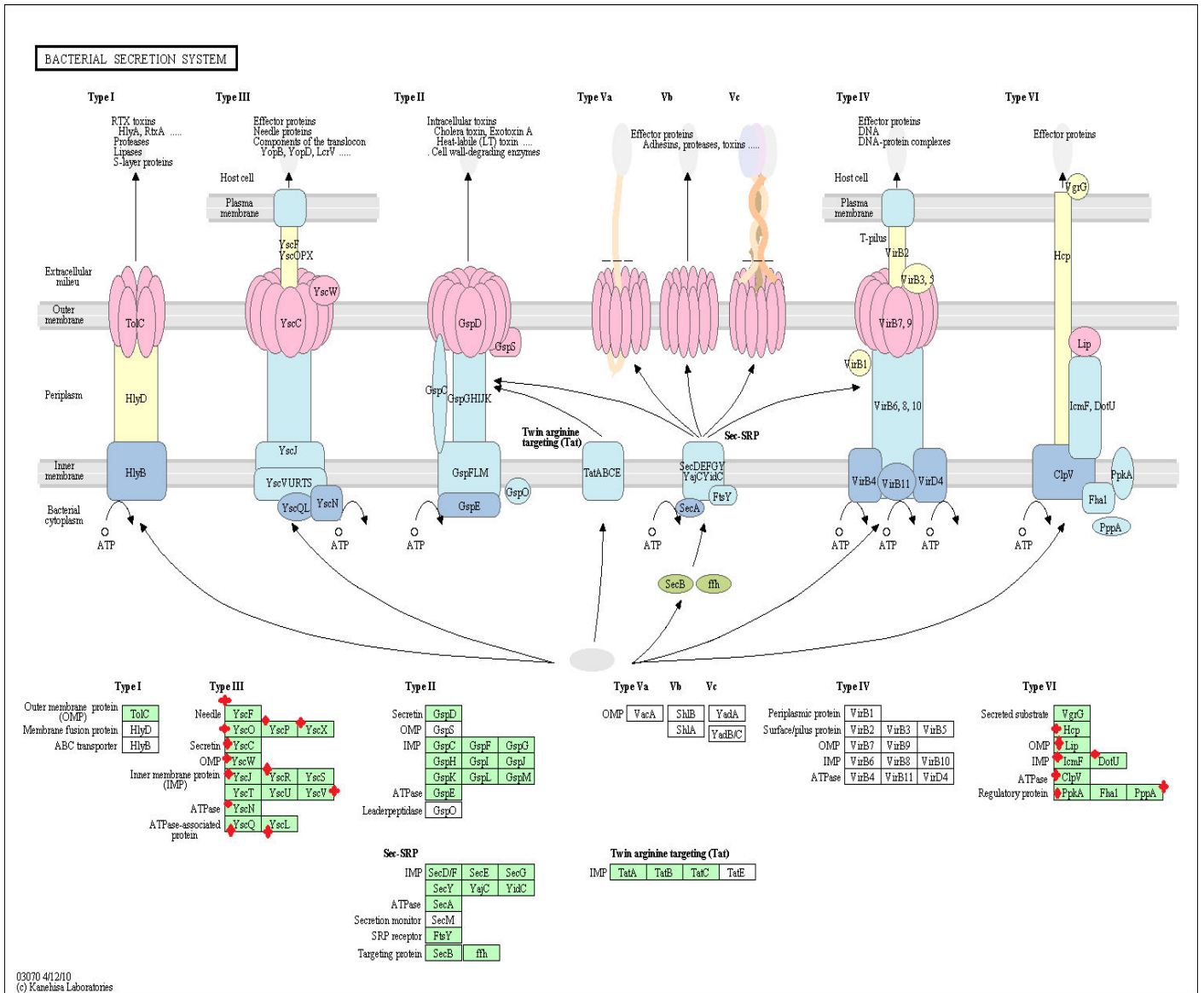


Figure n°7 : Les gènes réprimés dans les systèmes de sécrétion bactérienne (marqués en rouge).

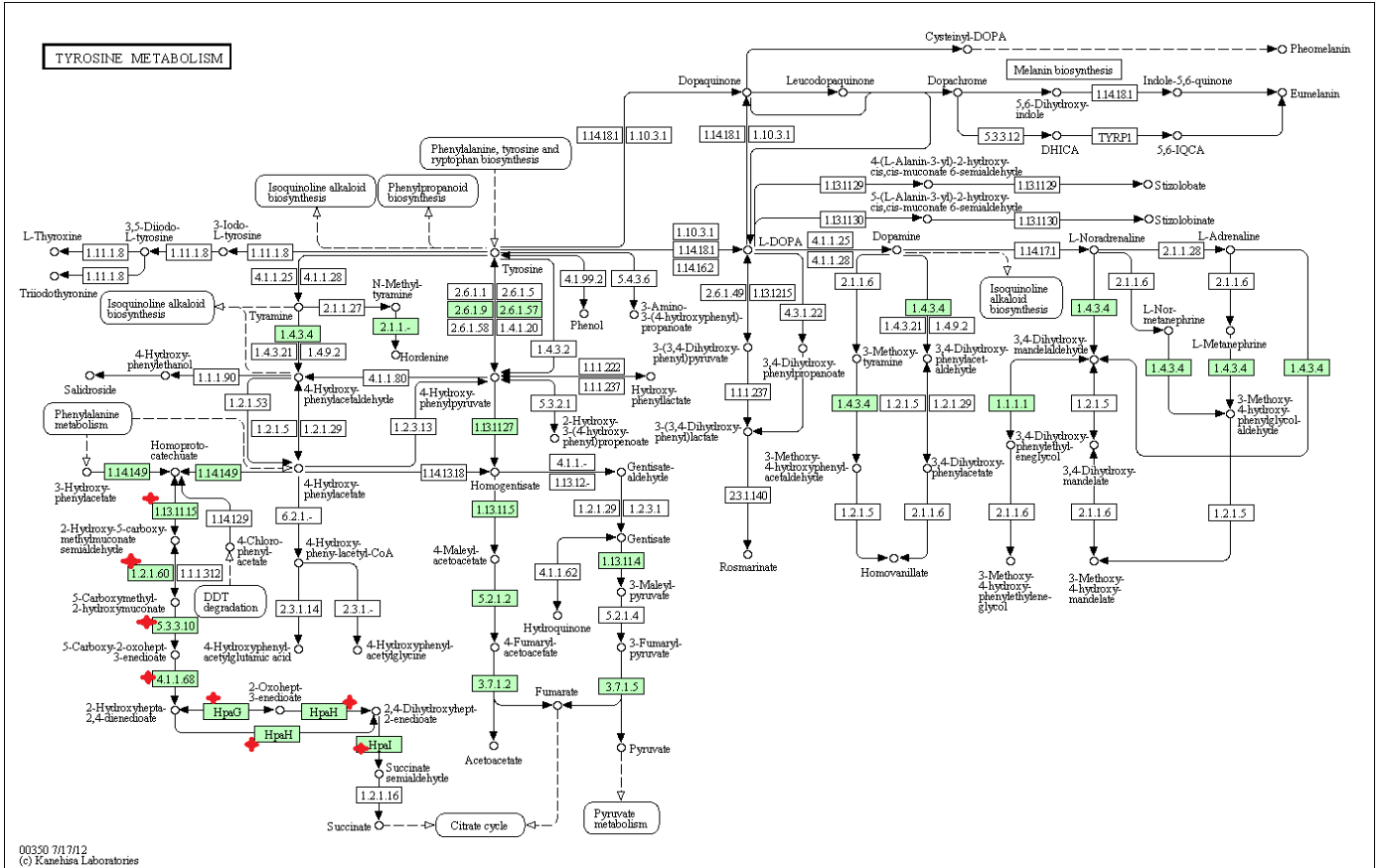


Figure n°8 : Les gènes réprimés dans le métabolisme de la tyrosine (marqués en rouge).

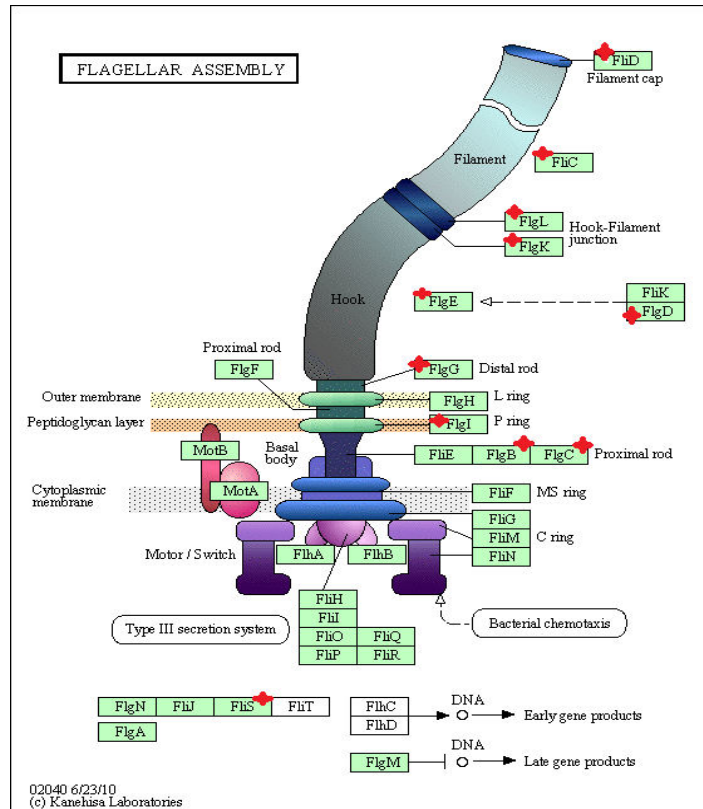
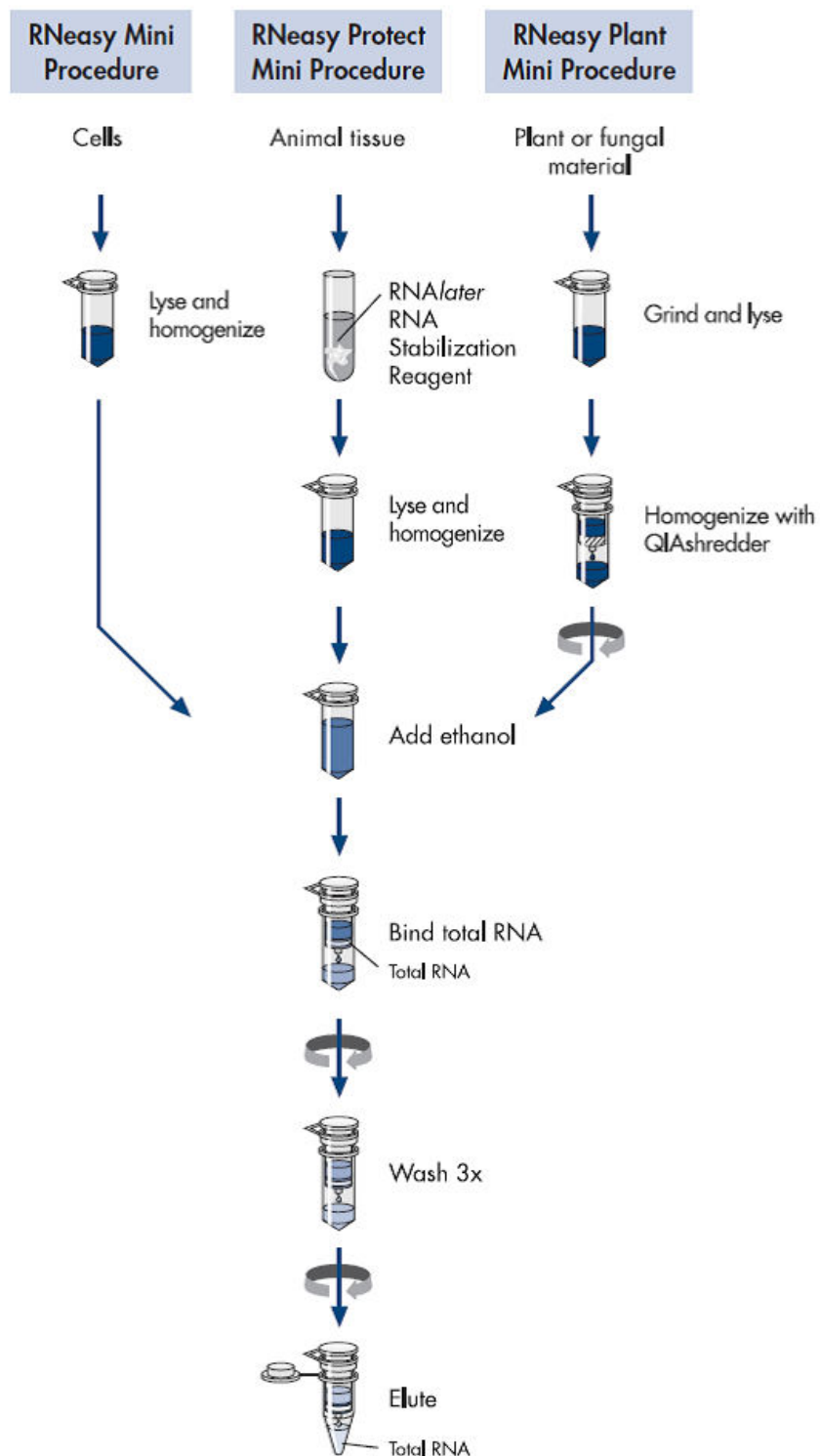


Figure n°9 : Les gènes réprimés dans le mécanisme d'assemblage du flagelle (marqués en rouge).

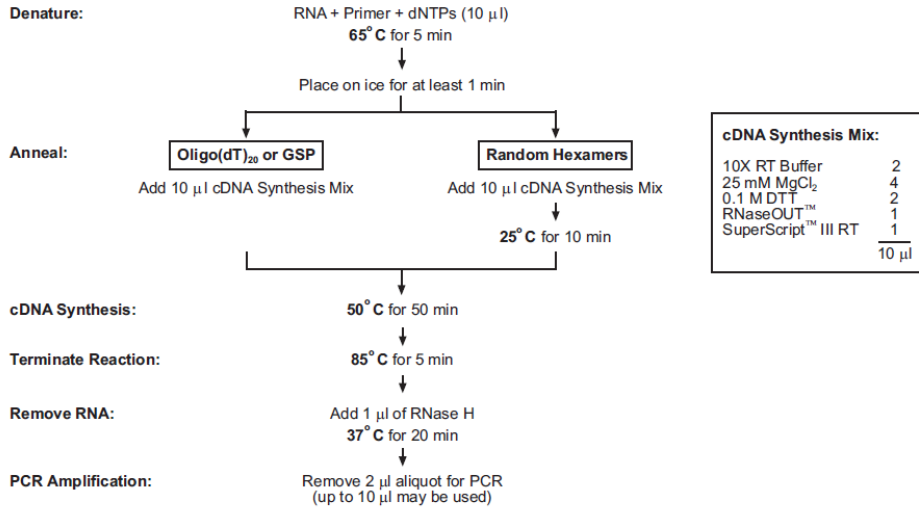
## Annexe n°3 : Les protocoles des kits utilisés

### 1- RNeasy Mini Kit (Qiagen) :



## 2- SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

### Summary of Procedure



18080051.pps

Rev. date: 3 Oct 2003

SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. 2003.

### 3- Qiagen PCR Purification Kit :

1. Add 5 volumes Buffer PB to 1 volume of the PCR reaction and mix. If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l 3 M sodium acetate pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn yellow.

2. Place a QIAquick column in a provided 2 ml collection tube or into a vacuum manifold. For details on how to set up a vacuum manifold, refer to the *QIAquick Spin Handbook*.

3. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge 30-60 s or apply vacuum to the manifold until all the samples have passed through the column. Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube.

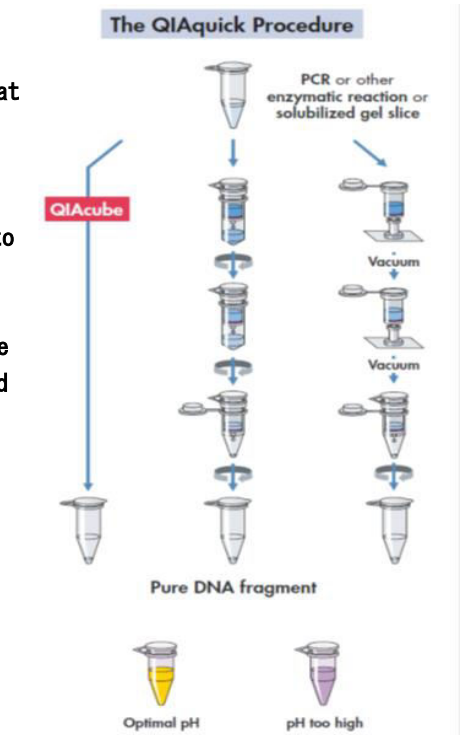
4. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30-60 s or apply vacuum. Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube.

5. Centrifuge the QIAquick column once more in the provided 2 ml collection tube for 1 min to remove residual wash buffer.

6. Place each QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

7. To elute DNA, add 50  $\mu$ l Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0-8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. For increased DNA concentration, add 30  $\mu$ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.

8. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel



4- DNase I (Promega) :

1. Set up the DNase digestion reaction as follows:

RNA in water or TE buffer	1-8 $\mu$ l
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 $\mu$ l
RQ1 RNase-Free DNase	1u/ $\mu$ g RNA
Nuclease-free water to a final volume of	10 $\mu$ l

Note: Use 1 unit of RQ1 RNase-Free DNase per microgram of RNA. For smaller amounts of RNA, use 1 unit of RQ1 RNase-Free DNase per reaction.

2. Incubate at 37° C for 30 minutes.

Note: If analyzing RNA samples by gel electrophoresis, perform a phenol:chloroform extraction and ethanol precipitation before loading the samples on the gel because salts in the RQ1 DNase Reaction Buffer and Stop Solution may cause aberrant migration or smearing of RNA on gels. Steps 3 and 4 may be omitted if a phenol:chloroform extraction is performed.

3. Add 1  $\mu$  l of RQ1 DNase Stop Solution to terminate the reaction.

4. Incubate at 65° C for 10 minutes to inactivate the DNase.

5. Add all, or a portion of, the treated RNA to the RT-PCR. See the Access RT-PCR System Technical Bulletin #TB220 (5).

5- La terminal deoxynucleotidyl transferase (Promega) :

**A. Protocol**

Materials to Be Supplied by the User :

- 0.2M EDTA
- 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.8)
- Whatman® DE-81 2.3cm circular filters

1. Dilute 1µl of the reaction mixture into 100µl of 0.2M EDTA. Spot 3µl of this solution onto each of four Whatman® DE-81 2.3cm circular filters.
2. Dry the filters briefly under a heat lamp. Set two filters aside for use in determining total cpm.
3. Wash the other two filters in 50ml of 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.8) twice for 5 minutes each to remove unincorporated nucleotides.
4. Dry the washed filters under a heat lamp.
5. Add the appropriate scintillation fluid to each filter and count in a scintillation counter.

**B. Example of a Standard Calculation**

$$\% \text{ incorporation} = \frac{\text{incorporated cpm}}{\text{total cpm}} \times 100$$

$$\text{Total cpm incorporated} = \text{incorporated cpm} \times \text{dilution factor} \times \frac{\text{total reaction volume}}{\text{volume counted}}$$

$$\text{Average number of bases added to each primer} = \frac{\% \text{ incorporation}}{100} \times \text{molar ratio of nucleotide to primer present in the reaction}$$

$$\text{Amount of DNA synthesized} = \text{average number of bases added per primer} \times 330\text{pg/pmol base} \times \text{pmol primer present in reaction}$$

$$\text{Specific activity of probe} = \frac{\text{total cpm incorporated}}{\mu\text{g of DNA template} + \mu\text{g DNA synthesized}}$$



## **Références**

### **A**

Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nkagawa, A. Nakae, T. 2004. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa* : dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* 279(51) : 52816-9.

Alain Filloux, Isabelle Vallet. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *MEDECINE/SCIENCES* 2003 ; 19 : 77-83

Alain NICOLAS. 2004. Applications de la technologie des puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Université Pierre et Marie Curie .1 vol., [230]

Anderson, M., P., Gregory, R., G., Thompson,, S., Souza, D., W., Paul, S., Mulligan, R., C., Smith, A., E., and Welsh M., J. 1991. Demonstration that CFTR is chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016): 202-5.

### **B**

Baltimore, R.S., Christie, C.D. & Smith, G.J. (1989) Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis* 140(6), 1650-61.

Becq, F. 2003. CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2 : 325s-332s.

Burns, J.L.,Gibson,R.L.,McNamara,S.,Yim,D.,Emerson,J.,Rosenfeld,M.,Hiatt,P., McCoy, K.,Castile,R.,Smith,A.L.,Ramsey,B.W.,2001. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis.*J.Infect.Dis.* 183, 444–452.

Bert, F. and Lambert-Zechovsky , N. (1996). Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas Aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother* 37(4) : 809-13.

### **C**

Cornelis, G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825.

### **D**

Dao Nguyen and Pradeep K. Singh. Evolving stealth: Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *PNAS* \_ May 30, 2006 \_ vol. 103 \_ no. 22 \_ 8305–8306

Darling, K.E., Dewar, A. & Evans, T.J. (2004) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 6(6), 521-33.

David A. D'Argenio, Manhong Wu, Lucas R. Hoffman, Hemantha D. Kulasekara, Eric Déziel, Eric E. Smith, Hai Nguyen, Robert K. Ernst, Theodore J. Larson Freeman, David H. Spencer, Mitchell Brittnacher, Hillary S. Hayden, Sara Selgrade, Mikkel Klausen, David R. Goodlett, Jane L. Burns, Bonnie W. Ramsey and Samuel I. Miller. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients *Molecular Microbiology* (2007) 64(2), 512–533

## E

El'Garch, F. Jeannot, K., Hocquet, D., Llans-Barakat, C. and Plésiat, P. (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 51(3): 1016-21.

Emmanuel Paradis. 2005. R pour les débutants. Institut des Sciences de l'Evolution. France.

Eric E. Smith, Danielle G. Buckley, Zaining Wu, Channakhone Saenphimmachak, Lucas R. Hoffman, David A. D'Argenio, Samuel I. Miller, Bonnie W. Ramsey, David P. Speert, Samuel M. Moskowitz, Jane L. Burns, Rajinder Kaul, and Maynard V. Olson. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. 2006. *PNAS* \_ vol. 103 \_ no. 22 \_ 8487–8492

Eyal Amiel, Rustin R. Lovewell, George A. O'Toole, Deborah A. Hogan, and Brent Berwin. *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression. *INFECTION AND IMMUNITY*, July 2010, p. 2937–2945

## F

Falagas, M. E. and Kasiakou, S. K. (2005). Colistin : the revival of polymixin for the management of multidrug-resistance Gram-negative bacterial infection. *Clin Infect Dis* 40(9): 1333-41.

Fauci, A. S. *Infectious diseases: considerations for the 21st century*. (2001). *Clin Infect Dis* 32 (5): 675-85.

## G

Galan, J.E., and Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.

Galimand, M., Courvalin, P. And Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance of aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8) : 2565-71.

Gerald B. Pier. The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. July 2, 2012 G. Pier is at the Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

Girlich, D., Naas, T. and Nordmann, P. (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinases OXA-50 of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6): 2043-8.

Gisk, C. G., Buaro, L., Sundsfjord, A. and Wretling, B. (2008). Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 14(1): 23-30.

Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M. & Wilson, J.M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88(4), 553-60.

## H

Hagins, J.M., Locy, R., Silo-Suh, L., 2009. Isocitrate lyase supplies precursors for hydro- gen cyanide production in a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191, 6335–6339.

Hancock, R. E., and Wong, P. G. (1984). Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas Aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 26(1) : 48-52.

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.

Hoboth, C., Hoffmann, R., Eichner, A., Henke, C., Schmoltdt, S., Imhof, A., Heesemann, J., Hogardt, M., 2009. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 200, 118–130.

Hoffman, L.R., Richardson, A.R., Houston, L.S., Kulasekara, H.D., Martens-Habbena, W., Klausen, M., et al. (2010). Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway. *PLoS Pathog* 6: e1000712.

## J

Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J.F., Powers, C.A., Schulert, G.S., Bar-Meir, M., Sullivan, C.L., McColley, S.A., and Hauser, A.R. (2004). Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 42, 5229-5237.

Jamie Weir, Alison D. Murray. , 20 nov. 1999. Atlas d'anatomie clinique: Radiologie et imagerie médicale. chapitre 1 : le thorax. De Boeck Supérieur.

Jayasimha Rao, F. Heath Damron, Marek Basler, Antonio DiGiandomenico, Nicholas E. Sherman, Jay W. Fox, John J. Mekalanos, and Joanna B. Goldberg. 2011. *Front Microbiol.* 2: 162.

Jeffrey L. Veessenmeyer, Alan R. Hauser, Thiago Lisboa, and Jordi Rello. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit Care Med.* 2009 May ; 37(5): 1777–1786.

J.-M. BIDART et L. LACROIX. 2007. Puces à ADN. Méthodes d'étude du génome et du transcriptome .Méthodes d'études en biologie moléculaire. Chapitre 24. 372-384

Jocelyne Derelle. La mucoviscidose de l'enfant à l'adulte .John Libbey Eurotext, 1998 - 252 pages

Johansen, H. k., Moskowitz, S. M., Ciofu, O., Pressler, T. and Hoiby, N. (2008). Spread of colistin resistant non mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* among chronically infected Danish cyctic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 7(5): 391-397.

Joris, L., Dab, I. & Quinton, P.M. (1993) Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev Respir Dis* 148(6 Pt 1), 1633-7

## K

Kadurugamuwa, J. L., Lam, J. S. and Beveridge, T. J. (1993). Interaction of gentamicin with the A band and B band lipopolysaccharides of *Pseudomonas Aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4) : 715-21.

Keith Poole. Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms .*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2001) 3(2): 255-264.

Kelsi M. Sandoz, Shelby M. Mitzimberg, and Martin Schuster. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. 2007 October 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(40): 15876–15881.

Kong, K. F., Jayawardena, S., R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tummler, B. and Mathee, K. (2005). Characterization of *poxB*, a chromosomal encoded *Pseudomonas Aeruginosa* oxacillinases. *Gene* 258 : 82-92.

## L

Lander, E.S., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., and Faure, K. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med* 39, 2113-2120.

Lei Yang, Lars Jelsbak and Søren Molin. 2011. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. Denmark. *Environmental Microbiology* ( ) 13(7), 1682–1689.

LeVine, A. M., Kurak, A. E., Bruno, M. D., Stark, J. M., Whitsett, J. A. and Korfhagen, T. R. (1998). Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas Aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4): 700-8.

Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T and Tsuchiya, T. (2003). A new member of tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OperM, in *pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 52(4): 572-5.

Lillian Sholtis Brunner, Suzanne C. Smeltzer, Brenda Bare, Doris Smith Suddarth. *Soins infirmiers en médecine et en chirurgie : Fonctions respiratoire, cardiovasculaire et hématologique*, Volume 2. édition 2006 Chapitre 26 affections chroniques des voies respiratoires page 167.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L. & Pier, G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15(2), 194-222.

## M

**Magnet, S. and Blanchart, J. S. (2005).** Molecular insights into aminoglycosides action and resistance. *Nature* 426(6964): 306-10.

**Maria D. Maciá, Nuria Borrell, José L. Pérez, and Antonio Oliver. 2004 July.** Detection and Susceptibility Testing of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains with the Etest and Disk Diffusion. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(7): 2665–2672.

**Mérens, A., Llanes, C., Pourcel, C., Roussel-Delvallez, M., Vergnaud, G., Cavallo, J. D. and Plésia, P. (2009).** Resistance and epidemiology of *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: a French multi-centre study. *ECCMID poster* 1505.

**Mena, A., E. E. Smith, J. L. Burns, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Perez, and A. Oliver. December 2008.** Genetic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients Is Catalyzed by Hypermutation. *J. Bacteriol.* vol. 190 no. 24 7910-7917

**Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., and Cornelis, G. 1990.** Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58, 2840-2849.

**Mike S. Son, Wallace J. Matthews, Jr., Yun Kang, David T. Nguyen, and Tung T. Hoang. In Vivo Evidence of *Pseudomonas aeruginosa* Nutrient Acquisition and Pathogenesis in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. INFECTION AND IMMUNITY, Nov. 2007, p. 5313–5324**

**Mingeot-Leclercq, M. P., Glupezynski, Y. and Tulkens, M. P. (1999).** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43(4): 727-37.

**Munck, A., Sahler, C., Briard, M., Vidailhet, M., and Farriaux, J., P. (2005).** *Arch Pediatr* 12(6): 646-9.

## N

**Nicole Renders, Henri Verbrugh, Alex Van Belkum. Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Infection, Genetics and Evolution 1 (2001) 29–39.**

## O

**O’Toole, G.A., and Kolter, R. (1998a)** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304.

**Olivier CROCE, Conception de puces à ADN pour l'identification d'organismes. novembre 2005.**

## P

Philippe Glaser Unité de génomique des micro-organismes pathogènes. Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries. Institut Pasteur, M/S : médecine sciences, vol. 21, n° 5, 2005, p. 539-544.

Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S., Olsen, J.C., Johnson, L.G., Yankaskas, J.R. & Goldberg, J.B. (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271(5245), 64-7.

Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J.L., Galabert, C., Beghin, L., Beermann, C., Gottrand, F., and Husson, M.O. (2008). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. *Med Mal Infect* 38, 318-323.

Plotkowski, M.C., Chevillard, M., Pierrot, D., Altemayer, D., Zahm, J.M., Colliot, G. & Puchelle, E. (1991) Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture. *J Clin Invest* 87(6), 2018-28.

Pool, K (2004). Efflux mediated multiresistance in GramNegatif bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10 (1):12-26.

Pool, K (2005). Aminoglycosides resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 749-87.

Prescot, Harley & Klein (1995) Les bactéries Gram-négatives d'importance générale, médicale ou industrielle. In *Microbiologie*, pp. 426-448. Bruxelles : De Boeck-Wesmael S. A. pour la traduction française.

## R

Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. and Lam , J. S. (1999). Genetics of O-antigen Tbiosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbial Mol Biol Rev* 63(3): 523-53

Roger, P., Puchelle, E., Bajolet-Laudinat, O., Tournier, J.M., Debordeaux, C., Plotkowski, M.C., Cohen, J.H., Sheppard, D. & de Bentzmann, S.(1999) Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 13(6), 1301-9.

Rommen, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., and al. 1989. Identification of the cyctic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 245 (4922): 1059-65.

Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., Swanson, B.L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D.W., and Wiener-Kronish, J.P. (2001). Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 183, 1767-1774.

Rozenn Le Berre. 20 mai 2011. INFECTIONS PULMONAIRES ET MUCOVISCIDOSE. DESC Maladies Infectieuses et Tropicales,

## S

Saiman, L., Cacalano, G., Gruenert, D. & Prince, A. (1992) Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immun* 60(7), 2808-14.

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) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8487–8492.

Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P. & Welsh, M.J. (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85(2), 229-36.

Sofía Feliziani, Adela M. Luján, Alejandro J. Moyano, Claudia Sola, José L. Bocco, Patricia Montanaro, Liliana Fernández Canigia, Carlos E. Argaraña, Andrea M. Smania. 2010. Mucoidy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. *PLoS ONE* 5(9): e12669.

## T

Tager, A.M., Wu, J. & Vermeulen, M.W. (1998) The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4), 643-52.

Trias, J. and Nikaido, H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyses facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 34(1): 52-7.

## V

Venter, J.C., et al., The sequence of the human genome. *Science*, 2001. 291(5507): p. 1304-51.

## W

Walsh, C. *Antibiotics : actions, origins, resistance.* (2003). Washington, D.C., ASM Press.

Wilkinsons, S. G. (1996). Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Prog Lipid Res* 35(3): 283-343.

Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 15, 1037-1056.

Wills, P.J., Hall, R.L., Chan, W. & Cole, P.J. (1997) Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *J Clin Invest* 99(1), 9-13.

## Y

Yahr, T.L., Goranson, J., and Frank, D.W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 22, 991-1003.

Yokoyama, H., Maseda, H., Yamabayashi Ta, T. A., Izumi, S., and Nakae, T. (2002). Secondary-site mutation restores the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 244(3) : 898-902.

## Z

Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms : drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 37(2): 219-25.

### LES SITES INTERNET:

[http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/puces/Les\\_puces\\_a\\_ADN.html](http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L3CAB/puces/Les_puces_a_ADN.html) ( Viard Bruno et Errachid Céline. 2006. Projet tutoré : les puces à AND)

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/> (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis)



## Résumé :

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram négatif à caractère opportuniste, colonisant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Son implantation aggrave la symptomatologie et son éradication devient quasi impossible à la phase chronique.

Dans le but d'une thérapie plus efficace, l'étude des phénomènes d'adaptation de *P. aeruginosa* devient une nécessité. En effet, par cette étude nous avons tenté de mieux comprendre les changements de l'expression génique bactérienne qui s'opèrent entre la phase aiguë et la phase chronique. Notre étude s'est reposée sur l'analyse de données issues de puces à ADN réalisées sur le transcriptome de *P. aeruginosa*. Les outils bio-informatiques ont été notre support d'investigation.

Les résultats obtenus ont montré une baisse de l'expression des gènes de virulence de *P. aeruginosa* à savoir les gènes du système sécrétoire de type III et ceux de l'assemblage du flagelle. Par ailleurs, l'expression génique du métabolisme de la valine et du métabolisme des acides gras a été régulée à la hausse. Ces changements pourraient être un élément clé de la résistance par suppression des facteurs immunogènes ou par modification des cibles des antibiotiques ainsi que l'adaptation nutritionnelle aux éléments présents dans les voies aériennes. La connaissance de ces voies modifiées nous offre la perspective de nouvelles stratégies d'attaque et la possibilité d'un traitement plus ciblé.

Mots clé : *Pseudomonas aeruginosa*, mucoviscidose, adaptation, régulation, résistance.

## Abstract:

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic germ, colonizing the airways of cystic fibrosis patients. Its presence aggravates the symptoms and becomes almost impossible to eradicate at the chronic phase.

In order to more effective therapy, the study of the phenomena of adaptation of *P. aeruginosa* becomes a necessity. Indeed, in this study we have attempted to better understand the changes in bacterial gene expression occurring between the acute phase and the chronic phase. Our study has relied on the analysis of data from microarray performed on the transcriptome of *P. aeruginosa*. Bioinformatics tools have been supporting our investigation.

The results showed a decrease in the expression of virulence genes of *P. aeruginosa*, namely genes of type III secretory system and those of the assembly of the flagellum. By cons, gene expression of the valine metabolism and fatty acid metabolism were upregulated. These changes could be a key element of resistance by removing immunogenic factors or modifying antibiotics targets as well as adaptation to nutritional elements present in the airways. Knowledge of these pathways change offers the prospect of new strategies of attack and the possibility of more targeted treatment.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, adaptation, regulation, resistance.