

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

CLÉOPHÉE VAN MAELE

Le 6 décembre 2023

Gènes essentiels et voies métaboliques de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant à l'origine de la pathogénicité vis-à-vis de l'épithélium des voies respiratoires humaines (GOAL)

Thèse dirigée par le

Professeur THOMAS GUILLARD, Université de Reims Champagne-Ardenne

JURY

Mme Katy JEANNOT,	Professeure,	Université de Franche Comté,	Président du jury
M. Thomas GUILLARD,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
M. David SKURNIK,	Professeur,	Université de Paris,	Rapporteur
M. Olivier BARRAUD,	Professeur,	Université de Limoges,	Rapporteur
Mme Sylvie CHEVALIER-LAURENCY,	Professeure,	Université de Rouen Normandie,	Examineur

À mes proches,
Aan mijn dierbaren,

Remerciements

J'aimerais remercier la Professeure Myriam Polette, directrice de l'Unité Inserm UMR-S 1250, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon stage de master 2 puis durant mes trois années de thèse.

Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du jury, Monsieur le Professeur David Skurnik de l'Université de Paris et Monsieur le Professeur Olivier Barraud de l'Université de Limoges pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Mes remerciements vont également à Madame la Professeure Sylvie Chevalier-Laurency de l'Université de Rouen Normandie et à Madame la Professeure Katy Jeannot de l'Université de Franche Comté pour leur participation à ma soutenance de thèse en tant qu'examinateur. Merci pour vos précieux conseils et vos recommandations qui m'ont permis de faire avancer ce travail.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse le Professeur Thomas Guillard. Merci de m'avoir fait confiance pour ce projet, pour ta disponibilité, tes conseils, ta patience et surtout pour avoir toujours su voir les choses avec optimisme. Je m'estime chanceuse d'avoir eu un encadrant comme toi. Merci pour ton accueil et les moments de convivialité partagés avec le reste de l'équipe bactério.

Un merci particulier à Sophie « la fée magique » sans qui ces trois années n'auraient pas eu la même saveur. Tu es une des plus belle personne que je connaisse. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, que ce soit par ton expertise scientifique ou bien en tant qu'amie. Merci pour nos discussions et pour tous les petits gâteaux. Je te souhaite le meilleur, tu le mérites tellement ! N'en doute jamais.

Anaëlle, merci à toi également pour ton accueil au sein de l'équipe bactério et ton soutien pendant ses trois ans. Tu as su me remotiver quand j'avais l'impression de n'arriver à rien, et m'apporter un œil positif en plus de bons conseils pour améliorer mon travail. Je te souhaite d'obtenir de super résultats pour la suite de tes recherches (je l'ai personnellement demandé au dieu de la recherche).

Merci également à Marion, dernière arrivée dans l'équipe avant mon départ. Malgré le peu de temps que nous avons passé ensemble, je te remercie d'avoir été là pour moi pour ma période la plus stressante. Tu es un vrai rayon de soleil du sud et j'espère que notre temps gris rémois ne te fera pas perdre le sourire. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse.

Merci également aux nombreux étudiants qui sont passés dans l'équipe bactério au fils de ces trois ans : Vivien, Mathieu, Maïwenn, Adrien, Léon, Nathan, Clara et particulièrement Léa et Marin qui ont travaillé arduement sur ce sujet avec moi. Léa, tu as été la première qui a travaillé sur mon sujet et je n'aurais pas pu rêver mieux, tu étais acharnée dans ton travail sachant que les mutants t'en ont fait voir de toutes les couleurs et j'ai pu découvrir au fils des mois une personne formidable. Marin, je n'aurais jamais obtenu mes infections sans toi, merci pour tout le temps que tu as accordé à mes souches (en délaissant les tiennes), tu as sauvé ma fin de thèse et je t'en serais éternellement reconnaissante.

Merci à vous tous d'avoir partagé de nombreuses soirées avec nous et d'avoir amené joie et bonne humeur pendant les semaines/mois que vous avez passés avec nous.

Petite pensée également pour Aglaée, ton passage rapide au sein de l'équipe aura marqué les esprits.

Je ne peux pas oublier de mentionner mes collègues doctorants qui sont devenus bien plus que ça, des amis précieux (je vais tenter de ne pas être trop mielleuse) :

Laure, mon encadrante non officielle de thèse, merci pour tout le temps que tu as passé à réfléchir avec moi sur mes soucis de manip, à me remonter le moral lors des mauvais jours et à gérer mes grands moments de panique lors de ma fin de thèse. Ton investissement pour ce travail de recherche ne sera jamais oublié. Je suis heureuse d'avoir eu la chance de rencontrer et de travailler avec quelqu'un comme toi, j'espère avoir récupéré un peu de ta force de caractère et je t'admire beaucoup. Tu es une femme entière et dévouée et je te souhaite le meilleur dans ta carrière future et dans ta vie personnelle, mais je dis ça en comptant bien être là pour le voir !

Emma, mon acolyte gémeaux. Je me suis beaucoup retrouvée à travers toi (peut-être même un peu trop, au point que l'on se retrouve à être habillée pareil fréquemment). Merci pour ton soutien, ton aide et pour les nombreuses fins d'après-midi pour lesquelles tu m'as tenue compagnie au labo. Tu mérites ce que tu as, tu es capable, tu es intelligente et douée dans ce que tu fais. Ce sont des mots que je n'aurais jamais la sagesse d'avoir envers moi-même alors je te les donne. Jeune femme qui n'avait jamais quitté sa ville natale (d'ailleurs merci

également d'avoir fait le MT180 avec moi), j'espère que l'avenir te réserve une vie riche en bonheur et en découvertes.

Maëva, je suis très heureuse de tu sois restée parmi nous pour ta thèse, ça aurait été un grand vide sans toi. Merci pour nos discussions et tous les bons moments que nous avons passés. Tu as une patience à toute épreuve (ou presque) et ta ténacité et ta rigueur dans le travail sont un modèle à suivre, tu as de quoi être fière. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite et une fin de thèse avec encore des beaux papiers et peu de stress.

Les filles, merci de m'avoir toujours suivie dans mes bêtises, je garde précieusement en souvenir les moments de rires et de joie partagés avec vous. Merci pour les magnets que je garde précieusement en souvenir et j'espère vous en offrir une ribambelle à l'avenir. C'était moi la plus vieille mais c'était vous mes modèles !

Antony, nos discussions autour d'un macchiato caramel m'ont manquées depuis que tu es parti de l'autre côté de la planète ! Ton mindset est une source d'inspiration pour moi, un esprit de winner qui t'amènera loin dans ton travail. Merci pour tes conseils et nos débats enrichissants, que ce soit concernant la recherche ou la vie en général. Merci d'avoir amené de la vie et de la joie au labo, c'est aussi ça qui rend le travail agréable !

Théophile, mon ancien voisin de bureau, j'espère que tout va bien aller pour toi. Merci de m'avoir accueillie pour un moment sur le bureau d'en face, merci d'avoir supporté mes bêtises et d'avoir toujours été un bon ami envers moi. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à vous tous d'avoir été là pour moi pendant ces années, pour les moments passés que je n'oublierai jamais.

Un dernier petit mot pour Julie, la dernière arrivée chez les doc. Je n'ai malheureusement pas eu le temps de te découvrir au labo, mais je suis heureuse d'avoir eu l'occasion de le faire en dehors avec les filles. Je te souhaite bon courage et beaucoup de réussite pour ta thèse.

Merci également à l'ensemble de l'équipe de l'unité 1250 pour leur accueil, notamment Arnaud Bonnomet pour son aide sur l'utilisation du vidéomicroscope et l'analyse d'image, Émilie Luczka pour la culture cellulaire et Audrey Brisebarre pour son aide avec les statistiques et les analyses de séquençage.

Merci au Docteur Christophe Audebert et au Docteur Delphine Beury pour leur aide précieuse pour la réalisation du Tn-Seq et surtout au Docteur Ségolène Caboche pour son

travail remarquable sur l'analyse bioinformatique. Merci au Professeur Hervé Jacquier pour son aide avec l'analyse des MGR.

Merci également à mes proches pour leur soutien même s'il ne comprenait pas toujours ce que je faisais. Maman, Papa, merci de m'avoir permis d'aller jusque-là, vous m'avez toujours donné les moyens et l'ambition d'aller loin. Une pensée également pour mes grands-parents, Daniel, Claudette, Jackie et Denise. Kévin, merci pour ton soutien de tous les jours, surtout sur ces derniers mois, j'espère que j'arrive à te rendre toute cette bienveillance et cet amour au quotidien. Marion, merci d'être toujours là pour moi depuis toutes ces années, je suis tellement reconnaissante d'avoir quelqu'un comme toi dans ma vie, je serais toujours là pour toi.

Mon dernier remerciement revient au centre de ma vie, la prunelle de mes yeux, Effy. Si un chat a déjà été nommé en tant qu'auteur d'un papier, alors je peux bien te citer ici. Pour toutes les nuits blanches ou tu es restée près de moi pendant que j'écrivais et tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien, merci. Masha, je pense à toi également.

« Ayez le culte de l'esprit critique » - Louis Pasteur

*À bientôt pour de nouvelles aventures,
Cléophée*

Résumé

Selon l'Organisation mondiale de la santé, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) résistant aux carbapénèmes est une cible prioritaire pour la production de nouveaux antibiotiques. Ainsi, comprendre les mécanismes sous-jacents de l'infection de ces bactéries résistantes permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La perte de la porine OprD, principal déterminant de la résistance aux carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours, est décrite comme améliorant le fitness *in vivo* et la virulence bactérienne. Le séquençage à transposons à haut débit permet d'identifier des gènes essentiels (GE) pouvant s'avérer être des cibles thérapeutiques. Cette stratégie n'a pas encore été utilisée pour PA OprD mutant. Dans cette étude, nous avons identifié les GE spécifiques de PA14 OprD mutant pour la croissance en milieu LB, mis en évidence le gène *panC* codant la pantothénate synthétase comme cible thérapeutique prometteuse, et établi une liste de 30 GE de PA14 OprD mutant. Par CRISPRi, nous avons confirmé que l'inactivation de *panC* réduisait la croissance en LB, l'expression de *sigX*, dont la surexpression est associée à la fluidité membranaire, et l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (SAG). En considérant la « faiblesse » de PA14 OprD mutant due à une altération de la membrane consécutive à une diminution de SAG insaturés en l'absence de *panC*, nous avons montré que l'inactivation de *panC* augmentait le temps d'obtention de la mort des cellules bronchiques 16HBE. Ceci met en évidence le potentiel d'anti-virulence de l'inhibition de *panC* et sa pertinence en tant que cible pour le traitement des infections pulmonaires au PA OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Épithélium des voies aériennes, Infection, Résistance aux antibiotiques, OprD

Abstract

For the World Health Organization, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is a critical priority for which new antimicrobial drugs are needed. Consequently, understanding the underlying mechanisms of resistant bacteria infection will enable the identification of new therapeutic targets. Loss of the OprD porin is the main determinant of resistance to the last resort carbapenem antibiotics and has been described to enhance fitness in vivo and virulence. Transposon sequencing is a high-throughput sequencing technique that makes it possible to identify essential genes (EGs) that may turn out to be therapeutic targets. However, such a strategy has not yet been used for OprD-deficient *P. aeruginosa*. In this study, we identified the EGs specific to PA14 OprD mutant for LB growth and we established a list of 30 EGs among these, we highlighted the *panC* gene encoding pantothenate synthetase as a promising target. Using CRISPRi, we confirmed that silencing *panC* reduced LB growth, and decreased *sigX* expression, whose overexpression is associated with membrane fluidity, as well as the expression of genes involved in the fatty acid synthesis (FAS). Taking into account the weakness of PA14 OprD mutant due to an altered membrane consecutive to a decrease in unsaturated FAS in the absence of *panC*, we showed that silencing *panC* extended the destruction time of 16HBE airway cells. Overall, our findings highlighted the anti-virulence potential of *panC* inhibition and shed new light on its inhibition as a target for treating carbapenem-resistant OprD-defective PA lung infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Airway epithelium, Infection, Antibiotic resistance, OprD

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIÈRES.....	7
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION.....	13
GÉNÉRALITÉS.....	15
CHAPITRE 1 : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>.....	16
I. Caractéristiques générales – Historique.....	16
II. Caractéristiques microbiologiques	16
III. Caractéristiques génomiques.....	17
IV. Environnement	18
CHAPITRE 2 : INFECTIONS A <i>P. AERUGINOSA</i>.....	20
I. Différents types d'infections à <i>P. aeruginosa</i>	20
II. Infections pulmonaires.....	20
1. Le système respiratoire.....	20
2. Infections à <i>P. aeruginosa</i> chez les patients atteints de mucoviscidose	22
3. Infections à <i>P. aeruginosa</i> chez les patients atteints de BPCO.....	25
4. Infections à <i>P. aeruginosa</i> chez les patients sous ventilation mécanique	28
CHAPITRE 3 : PORINE OPRD ET RESISTANCE AUX CARBAPENEMES.....	29
I. Les porines chez <i>P. aeruginosa</i>	29
II. Les carbapénèmes.....	31
III. La porine OprD	32
IV. Résistance aux carbapénèmes via OprD	35
CHAPITRE 4 : TN-SEQ.....	37
I. Technologie Tn-Seq	37
1. Historique	37

2. Principe du Tn-Seq.....	38
II. Gènes essentiels chez <i>P. aeruginosa</i>	39
CHAPITRE 5 : PANTOTHENATE ET COENZYME A.....	41
I. Voie de biosynthèse du pantothénate.....	41
II. Voie de biosynthèse du Coenzyme A	42
III. Impact des modulations des voies sur les microorganismes.....	44
CHAPITRE 6 : ACIDES GRAS	45
I. Classification des acides gras.....	45
II. Voie de biosynthèse des acides gras	45
III. Acides gras et structure de membrane	47
1. Rôle des acides gras dans la structure de membrane.....	47
2. Régulateur de stress de membrane et synthèse des acides gras	48
<u>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL.....</u>	<u>50</u>
RÉSUMÉ	51
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	53
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	<u>104</u>
DISCUSSION GENERALE	105
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>109</u>
<u>SERMENT DOCTORAL D'INTÉGRITÉ SCIENTIFIQUE</u>	<u>124</u>

Communications scientifiques

- Communications affichées :

Identification des gènes essentiels *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

C. Van Maele, S. Caboche, T. Blanchot, A. Brisebarre, A. Muggeo, C. Audebert, T. Guillard
Journées de recherche respiratoire (J2R), Brest, France, 15/16 octobre 2021

Identification des gènes essentiels *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

C. Van Maele, S. Caboche, T. Blanchot, A. Brisebarre, A. Muggeo, C. Audebert, T. Guillard
Journées Rémoise des Jeunes Chercheurs en Santé (JRJCS), Reims, France, octobre 2022

Identification des gènes essentiels *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

C. Van Maele, S. Caboche, T. Blanchot, A. Brisebarre, A. Muggeo, C. Audebert, T. Guillard
MICROBES 2022 - 17^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Reims, France, 3-5 octobre 2022

Identification des gènes essentiels *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

C. Van Maele, S. Caboche, T. Blanchot, A. Brisebarre, A. Muggeo, C. Audebert, T. Guillard
Journées de recherche respiratoire (J2R), Reims, France, 15/16 octobre 2022

In vitro* identification of essential genes of carbapenems resistant OprD mutant *Pseudomonas aeruginosa

C. Van Maele, S. Caboche, T. Blanchot, A. Brisebarre, A. Muggeo, C. Audebert, T. Guillard
European Respiratory Society International Congress 2023 (ERS), Milan, Italie, 9/13 s

Distinction :

Premier Prix de Poster « Boehringer-Ingelheim France » :

Journée Rémoise des Jeunes Chercheurs en Santé de la SFR CAP – Santé, Reims, France, 21 octobre 2021

- Vulgarisation scientifique :

Finale régionale du concours Ma Thèse en 180 secondes (MT180)

- *Finale régionale du concours, Reims, France, mars 2022 - Premier Prix Jury*
- *Demi-finale nationale du concours, Paris, France, avril 2022*

Liste des abréviations

A

AA = Acides aminés
ACP = Protéine porteuse d'acyl
ADN = Acide désoxyribonucléique
AG = Acides gras

B

BPCO = Bronchopneumopathie
Chronique Obstructive

C

CCSP = *Club Cell Secretory Protein*
CF = Mucoviscidose
CFTR = *Cystic Fibrosis*
Transmembrane Conduction Regulator
CMI = Concentration minimales
inhibitrices

G

GE = Gènes essentiels
GS = *Gold Standard*

K

Kpb = Kilo paires de bases

L

LPSN = *List of Prokaryotic names with*
Standing in Nomenclature
LB = Lysogenic Broth

M

MEC = Matrice extracellulaire
MMPs = Métalloprotéinases
matricielles

O

OMS = Organisation Mondiale pour la
Santé
ORL = Otorhinolaryngologie

P

PA = *Pseudomonas aeruginosa*
PAVM = Pneumopathies acquises sous
ventilation mécanique
PCR = Réaction en chaîne par
polymérase
PLP = Protéine liant les pénicillines
pb = paires de bases

R

RT = Transcription inverse

S

SAG = Synthèse des acides gras

T

TA = Thymine-Adénine
Tn = Transposon
Tn-Seq = Séquençage à transposon

Liste des figures

Figure 1 : Imageries de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figure 2 : Schéma de l'organisation des différents types cellulaires au niveau de la trachée et des voies bronchiques.....	21
Figure 3 : Représentation schématique de l'impact de la mucoviscidose sur les organes et les voies respiratoires.....	23
Figure 4 : Prévalence des bactéries cliniquement impliquées dans des infections respiratoires en fonction de l'âge chez des patients CF.....	24
Figure 5 : Adaptations de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lors de l'infection des voies aériennes chez un patient CF	25
Figure 6 : Représentation schématique de l'impact de la BPCO sur les voies aériennes	26
Figure 7 : Schéma d'une porine chez <i>P. aeruginosa</i>	29
Figure 8 : Structure chimique des différents types de β -lactamines et de carbapénèmes	32
Figure 9 : Structure de la porine OprD.....	33
Figure 10 : Mécanismes de régulation de l'expression de la porine OprD.....	35
Figure 11 : Représentation schématique des principales altérations de la porine OprD altérant le passage des carbapénèmes au travers de la membrane	36
Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme "couper-coller" d'un transposon.....	37
Figure 13 : Réalisation d'une banque de mutants à transposon de type mariner.....	38
Figure 14 : Voie de biosynthèse du pantothénate chez <i>P. aeruginosa</i>	42
Figure 15 : Voie de biosynthèse de Coenzyme A à partir du pantothénate chez PA14.....	43
Figure 16 : Voie de synthèse et oxydation des acides gras	46
Figure 17 : Modification de la structure de membrane en fonction de la saturation des acides gras	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des porines de <i>P. aeruginosa</i> associées à leur fonction, leurs régulateurs et facteur sigma	30
Tableau 2 : Récapitulatif des listes de gènes essentiels publié pour <i>P. aeruginosa</i>	40

INTRODUCTION

Nous sommes actuellement confrontés à une pénurie de choix thérapeutiques pour traiter les patients infectés par des bactéries résistantes aux antibiotiques ; en particulier les bactéries Gram-négatives, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, qui fait notamment partie des 6 bactéries « ESKAPE ». De par leur pathogénicité et leurs résistances, elles sont prioritaires pour la recherche de nouveaux agents antimicrobiens (1). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la résistance aux antibiotiques causera jusqu'à 10 millions de décès par an, en 2050, et *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes est considéré comme une cible prioritaire pour le développement de nouveaux antibiotiques.

La perte de la porine OprD, qui est le canal d'entrée des carbapénèmes, entraîne la résistance de *P. aeruginosa* à cette classe d'antibiotiques de dernier recours. *P. aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste majeur, impliqué dans les infections des voies respiratoires, chez les patients atteints de mucoviscidose et de bronchopneumonie chronique obstructive, mais aussi chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs (2). L'épithélium des voies respiratoires humaines constitue une barrière physique et fonctionnelle prévenant l'infection pulmonaire par des agents pathogènes (3).

Le cas du mutant OprD a été étudié dans différents contextes dont des modèles de colonisation gastro-intestinale ou de la rate. Avec ces différents modèles, il a été observé une augmentation du fitness chez le mutant (4,5). Il a également été démontré qu'il présentait une virulence augmentée dans un modèle murin de pneumonie aigüe (6).

L'objectif de ce travail était de définir la liste de gènes essentiels (GE) spécifiques à PA14 OprD mutant afin de déterminer de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques efficaces dans le cas de souches résistantes aux carbapénèmes.

Pour cela, nous avons utilisé, d'une part, une approche génomique de type Tn-Seq pour déterminer les gènes essentiels de *P. aeruginosa* mutant *in vitro*. Nous avons ensuite vérifié biologiquement les GE identifiés par Tn-Seq. L'inhibition du GE (*panC*) validé a finalement été testé dans un contexte d'infection afin de déterminer s'il pouvait représenter une cible thérapeutique pour limiter le potentiel virulent de PA14 oprD mutant *ex vivo*. Ce projet s'inscrit dans un objectif plus large d'identification de nouvelles pistes pour l'élaboration de nouvelles cibles pour les thérapies alternatives et de surmonter ainsi la résistance aux antibiotiques.

GÉNÉRALITÉS

Chapitre 1 : *Pseudomonas aeruginosa*

I. Caractéristiques générales – Historique

De nos jours, une multitude d'espèces de *Pseudomonas* sont décrites dans la littérature. La première description de *Pseudomonas aeruginosa* remonte à 1872 par Schroeter qui le nomme *Bacterium aeruginosum* (7). Par la suite, ce sera le pharmacien militaire Carle Gessard qui en fera l'observation via les pansements de soldats, tachés d'un pigment bleu-vert caractéristique de cette bactérie, la pyocyanine. Il renommera en conséquence cette bactérie en tant que bacille pyocyanique en 1882 (8). En 1900, Migula lui donnera finalement le nom de genre *Pseudomonas* (7). Depuis ces premières observations, les avancées technologiques ont permis le regroupement des *Pseudomonas* sp. qui appartiennent au domaine des *Bacteria* (*Proteobacteria*), phylum des *Pseudomonadota*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonadales* et à la famille des *Pseudomonadaceae* (9).

À ce jour, plus de 500 espèces ont été référencées sur LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (10), mais le nombre d'espèces décrites est en constante augmentation (11).

II. Caractéristiques microbiologiques

P. aeruginosa est un bacille droit mesurant de 1-5µm de long et 0,5-1,0µm de large (8). C'est une bactérie à Gram négatif que l'on retrouve seule ou par paire. Elle est mobile grâce à un flagelle polaire monotriche permettant le *swimming* et le *swarming*, et également de nombreux pili, permettant le *twitching*, et notamment les pili de type 4 assurant virulence et mobilité (IVa) et conjugaison (IVb) (12,13). *P. aeruginosa* ne produit pas de spores et n'est pas capsulée.

P. aeruginosa est une bactérie aérobie strict, mais il est possible que certaines souches se multiplient lentement dans un milieu anaérobie en présence de nitrate. La température optimale de culture est de 37°C, mais *P. aeruginosa* peut croître à des températures allant de

4°C à 42°C. En laboratoire, cette bactérie ne nécessite pas de nutriments particuliers et pousse rapidement sur des milieux de culture classiques. Elle produit plusieurs pigments solubles tels que la pyocyanine (bleu-vert), la pyoverdine (jaune-vert) et la pyorubine (brun-rouge) (14) ou encore la pyomélanine (noir-brun) (15).

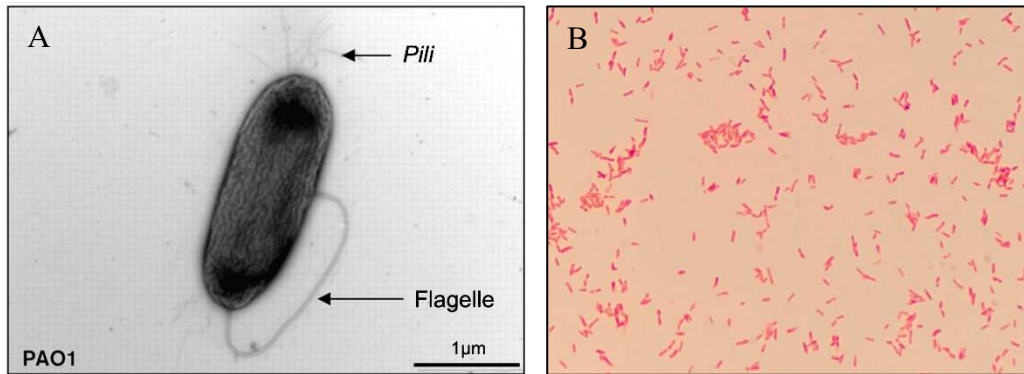


Figure 1 : Imageries de *Pseudomonas aeruginosa*

A) *P. aeruginosa* en microscopie électronique (d'après Lindhout et al. (16))

B) Coloration de Gram pour *P. aeruginosa* (x100)

En culture gélosée, les colonies ont un aspect opaque et convexe avec un bord légèrement rugueux et une couleur beige clair. Les pigments produits par *P. aeruginosa* peuvent donner une couleur tirant vers le vert à la gélose, d'aspect métallique sur gélose au sang (17). L'odeur de seringat caractéristique de *P. aeruginosa* résulte de la 2-aminoacétophénone (18). Chez les patients atteints de mucoviscidose (*cystic fibrosis*, CF), on peut retrouver des souches dites mucoïdes produisant de l'alginate. Il est également possible d'isoler des variants à petites colonies (*Small Colony Variant*) caractérisés par une pousse lente (de plus de 48 heures), une motilité réduite et une résistance accrue aux antibiotiques. Par ailleurs, *P. aeruginosa* peut croître sous forme de biofilm *in vitro* mais supposément dans les voies aériennes des patients atteints de CF également (19).

III. Caractéristiques génomiques

P. aeruginosa possède un large et unique chromosome circulaire composé de 5,5 à 7 millions de paires de bases (pb) codant en moyenne pour 6000 gènes environ. Parmi ces gènes sont retrouvés de nombreux régulateurs transcriptionnels, transporteurs et systèmes de régulation à deux composants qui confèrent à *P. aeruginosa* une grande diversité métabolique

et la capacité d'utiliser une large variété de nutriments, et par conséquent, une grande capacité d'adaptation à divers environnements (20,21).

Une étude réalisée en 2015 comparant les génomes de 17 souches de *P. aeruginosa* a défini un core genome de 5233 gènes communs à l'ensemble des souches, ce qui représente environ 88% du génome total (22). En 2019, une autre étude réalisée sur 9 souches de *P. aeruginosa* rapportait un core genome de 5109 gènes communs aux souches (23). Le core genome est très riche en gènes en lien avec le métabolisme et les systèmes de respiration, mais possède également des gènes de résistance aux antibiotiques et 59% des gènes de virulence. En complément du core genome, il existe des gènes dits « accessoires », généralement acquis d'autres espèces via des phages ou des plasmides et qui sont identifiables par le fait qu'ils ont généralement un GC% plus faible (+/-61.7%) contrairement aux gènes du core genome (+/-66%) (20,22).

IV. Environnement

La grande variété de gènes au sein des génomes de *P. aeruginosa* lui permet une adaptation à tout type d'environnements (24). Cette bactérie est couramment décrite comme omniprésente dans l'environnement (24–27) et préférentiellement dans les sols (28), et notamment les sols agricoles (29) et ceux contaminés aux hydrocarbures (30). On la retrouve également dans de nombreux types d'étendues d'eau (eau de mer, rivière, lac, eau du robinet, mais également piscine et piscine d'hydrothérapie (25,31–33)), *P. aeruginosa* est d'ailleurs présent au niveau des canalisations (34). *P. aeruginosa* est un pathogène des plantes et des animaux (35,36) comme les nématodes (37), insectes (38), poissons (39), reptiles (40) et divers mammifères (41,42).

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste chez les patients présentant des facteurs de risque (maladie sous-jacente comme la CF ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive, BPCO) (cf Chapitre 2). Compte tenu de son réservoir hydrique, *P. aeruginosa* est fréquemment retrouvé dans les services hospitaliers, notamment les zones humides (évier, siphons, douches, équipements respiratoires, vases, antiseptiques, matériel de nettoyage, etc. (43)). Ainsi, les contaminations exogènes se font volontiers à partir de ces réservoirs et de matériel contaminé

ou par les soignants ; les contaminations endogènes apparaissent plutôt à partir d'un site colonisé, comme les voies respiratoires ou la peau (44,45).

Chapitre 2 : Infections à *P. aeruginosa*

I. Différents types d'infections à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa reste un pathogène pouvant être à l'origine de différents types d'infections opportunistes comme des infections cutanées, ORL, oculaires, urinaires ou encore de bactériémie. Mais *P. aeruginosa* occasionne principalement des infections au niveau pulmonaire avec des pneumonies associées à des pathologies respiratoires sous-jacentes ou favorisées par la présence de matériels médicaux invasifs (27). *P. aeruginosa* est souvent retrouvé dans le milieu hospitalier, notamment dans les services de réanimation, ce qui favorise la présence de souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques (46), problème important pour les patients à risque exposés comme ceux atteints de CF, de BPCO, ou ceux admis en soins intensifs.

II. Infections pulmonaires

1. Le système respiratoire

Le système respiratoire permet les échanges gazeux dans le corps et donc l'oxygénation des organes par son interconnexion avec le système cardiovasculaire via la respiration. Il est divisé en deux parties : les voies supérieures regroupant les fosses nasales, le pharynx et se termine au niveau du larynx. L'air, passant ces zones, est filtré et réchauffé. Les voies inférieures regroupent la trachée et les bronches souches qui s'individualisent vers les lobes pulmonaires. Les bronches se subdivisent jusqu'aux bronchioles reliées aux alvéoles pulmonaires, lieu des échanges gazeux. Ces échanges sont possibles via le contact entre la paroi des alvéoles et les capillaires pulmonaires.

L'ensemble du système respiratoire est tapissé par un épithélium au contact de l'air. La trachée et les voies respiratoires proximales sont majoritairement composées d'un épithélium pseudostratifié regroupant différents types de cellules représentés en figure 3.

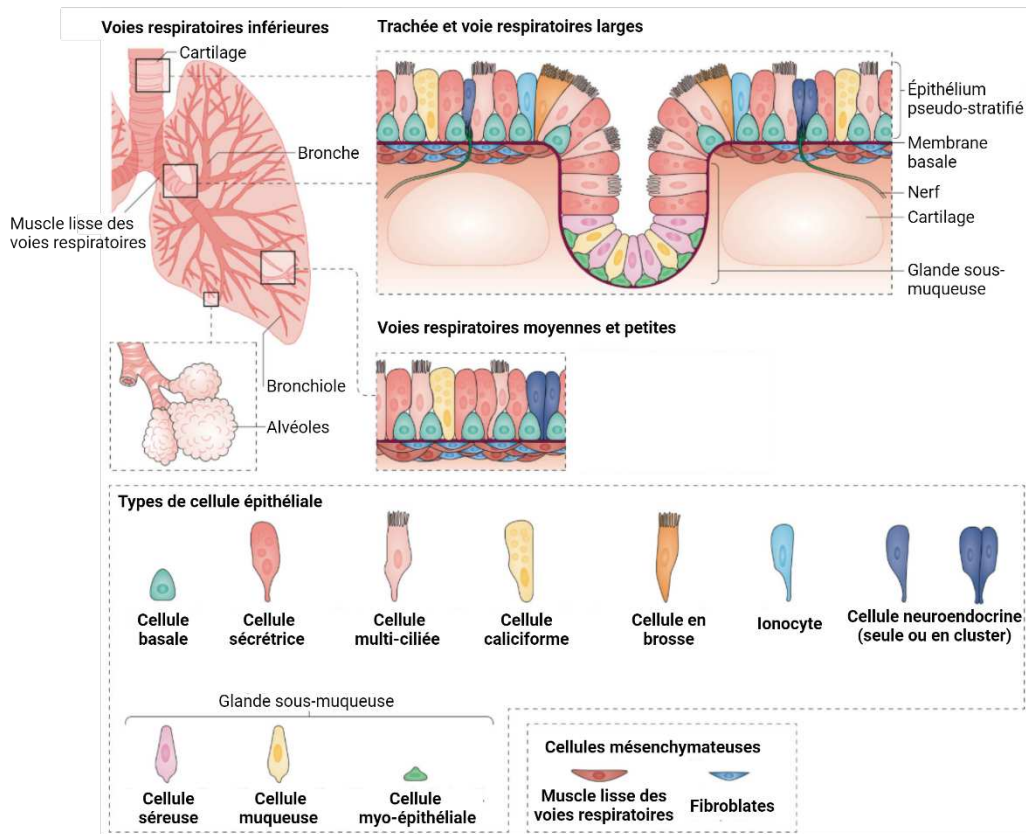


Figure 2 : Schéma de l'organisation des différents types cellulaires au niveau de la trachée et des voies bronchiques (adapté de Zepp JA et al. (47)).

Les cellules multiciliées sont le type cellulaire le plus abondant au niveau de l'épithélium respiratoire. Elles sont pourvues de cils moteurs dont le mouvement est possible selon la disponibilité en ATP. Elles permettent l'évacuation du mucus hors des voies respiratoires via la toux ou la déglutition vers le système digestif. Ce mucus est sécrété par les cellules caliciformes (*Goblet cells*) et joue un rôle de défense contre les particules présentes dans l'air et les micro-organismes. Ces cellules mucosécrétrices sont principalement présentes dans les voies aériennes proximales et contiennent des vacuoles mucigènes pour produire leur mucus (48). Cette production sera augmentée en cas d'inflammation comme par exemple celle induite par l'inhalation de la fumée de cigarette. Cependant, une surproduction peut être un indicateur de pathologies. Les cellules caliciformes aident également à produire le liquide péri-ciliaire qui permet la lubrification et protection de l'épithélium. Il forme une couche entre le mucus et les cellules de l'épithélium qui permet aux cils de battre pour déplacer le mucus (49). Les cellules ciliés et mucosécrétrices sont issues de cellules progénitrices appelées les cellules basales. Elles agissent comme des cellules souches résidentes qui permettent de régénérer l'épithélium respiratoire et bronchiolaire après une lésion. Ce sont des cellules multipotentes

(47). Des cellules neuroendocrines pulmonaires peuvent se regrouper pour former des corps neuro-épithéliaux formant des contacts synaptiques avec des fibres nerveuses. Elles sont capables de réguler l'homéostasie en détectant l'oxygénation et l'hypoxie. Au niveau des bronchioles, il y a une présence majoritaire de cellules Club. Ces cellules contribuent au maintien de la barrière épithéliale et sécrète des protéines, majoritairement la CCSP (*Club Cell Secretory Protein*) qui possède des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Ces cellules peuvent également se renouveler et se différencier en cellules ciliées (50).

Les canaux alvéolaires, les sacs alvéolaires et l'interstitium pulmonaire forment le parenchyme pulmonaire. Les alvéoles sont composées de cellules épithéliales alvéolaires. Les pneumocytes de type II sont des cellules cuboïdes et permettent de réduire la tension superficielle pendant la respiration en produisant le surfactant. Les pneumocytes de type I sont des cellules pavimenteuses représentant 95% de la surface d'échange gazeux en s'associant avec le plexus capillaire (47). Cet épithélium repose sur les septa inter-alvéolaire où se trouvent les vaisseaux sanguins. Les septa contiennent cellules endothéliales, (myo)fibroblastes, mastocytes et macrophages dans une matrice de fibres élastiques qui permettent les mouvements de dilatation et de rétraction des alvéoles. Lorsque les septa sont endommagées, cela provoque des emphysèmes.

2. Infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose

a) La mucoviscidose

La CF est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive (51). Principalement retrouvée dans les populations caucasiennes (52), il est estimé par la *Cystic Fibrosis Foundation* qu'il y aurait 105 000 cas diagnostiqués dans le monde (53). En France, le taux de porteurs sains est estimé à 1/30-1/35, soit environ 2 millions de personnes (54), ainsi pour une naissance sur 4500, l'enfant est porteur de la maladie (55). La CF est autant retrouvée chez les hommes que chez les femmes (56). Sept-mille-sept-cent-quarante-trois (7743) patients, 62,5% d'adultes, ont été recensés en 2022 par le registre français de la mucoviscidose (57). Auparavant considérée comme une pathologie infantile, ce pourcentage majoritaire d'adultes est lié à l'augmentation de l'espérance de vie des patients (en moyenne 10 ans de plus qu'il y a 10 ans).

Cette maladie est induite par une mutation du gène *cftr* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductionce Regulator*) qui code la protéine CFTR représentée en figure 4. Le gène *cftr* est situé sur le chromosome 7 et est constitué de 190 kilos paires de bases (kpb). La protéine CFTR est composée de 1480 acides aminés (AA) pour 168 kDa (58). Cette protéine est un canal ionique assurant le transport actif d'ions par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, notamment la sécrétion des ions chlorures hors des cellules (59). Cette protéine est exprimée au niveau des cellules épithéliales de divers organes comme les poumons, les intestins, la peau, le foie, le pancréas, etc (60) retrouvés en figure 4.

Plus de 1500 mutations pour le gène *cftr* ont été identifiées. La mutation la plus importante représentant deux tiers des mutations en Europe et Amérique du Nord est l'absence de phénylalanine en position 508 (connue sous le nom de Phe508del ou F508del). C'est une mutation de classe II (57,61). Lorsque ce gène est muté, le passage est bloqué, ce qui entraîne une augmentation de la réabsorption de sodium et d'eau, entraînant une forte déshydratation (61). Cela provoque une augmentation de sécrétion de mucus qui réduit la clairance mucociliaire des voies aériennes, ayant pour conséquence de favoriser la colonisation bactérienne (62). Par ailleurs, cela entraîne également de nombreux dysfonctionnements de divers organes représentés en figure 4.

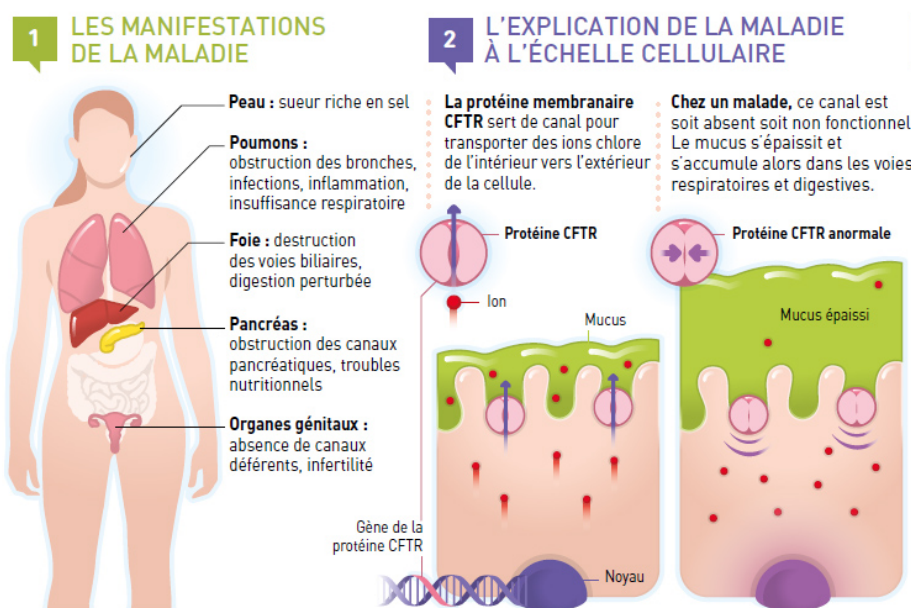


Figure 3 : Représentation schématique de l'impact de la mucoviscidose sur les organes et les voies respiratoires (adapté de Lorenzo Timon sur La Fondation pour la Recherche Médicale (56)).

b) Infections chez les patients atteints de mucoviscidose

Les colonisations bactériennes des voies aériennes retrouvées chez les patients atteints de CF diffèrent en fonction de l'âge avec une prévalence de *Streptococcus* sp. de 19% et *Haemophilus* sp. de 14% chez les enfants et les nourrissons contre une majorité de *Pseudomonas* sp. (18%) et de *Staphylococcus* sp. (9%) chez les patients adultes (63). Les prévalences des bactéries impliquées dans les infections des voies respiratoires chez les patients CF sont représentées en figure 5.

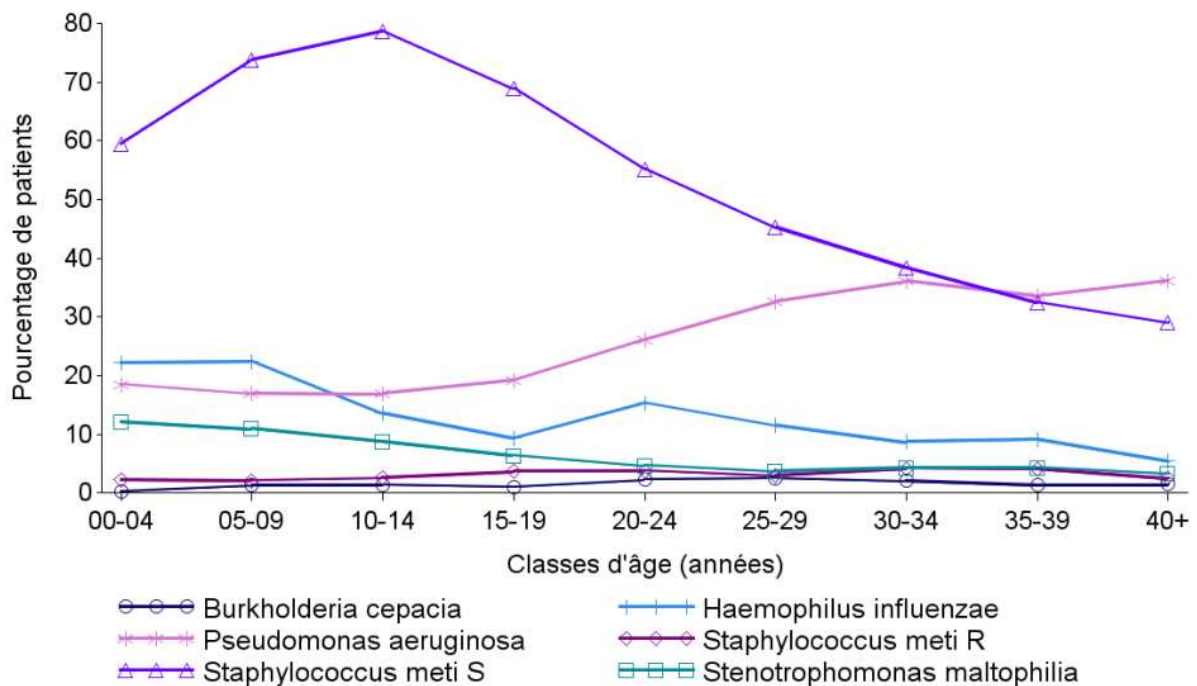


Figure 4 : Prévalence des bactéries cliniquement impliquées dans des infections respiratoires en fonction de l'âge chez des patients CF (d'après le Registre Français de la Mucoviscidose 2022 (57)).

P. aeruginosa est un facteur de morbi-mortalité chez les patients CF (19). En effet, 97,5% des patients auront présenté des infections à *P. aeruginosa* avant leurs 3 ans (64). Lors de ces premières infections, les stratégies antibiotiques mises en place sont efficaces dans la majorité des cas, mais les traitements répétés induisent une sélection des souches résistantes de *P. aeruginosa* au sein des voies respiratoires (65).

P. aeruginosa est capable d'adaptations pour persister dans les voies aériennes (représentées en figure 6), l'infection devient alors chronique et provoque une inflammation

continue induisant la destruction des cellules de l'épithélium pulmonaire (66). De plus, *P. aeruginosa* peut acquérir des mutations sous pression de sélection antibiotique qui verra l'émergence des mutants les plus adaptés à la colonisation chronique des voies respiratoires, comme par exemple avec l'acquisition de résistances aux antimicrobiens et à l'immunité, perte du flagelle et la diminution des facteurs de virulence (66,67). Ces adaptations sont représentées en figure 6.

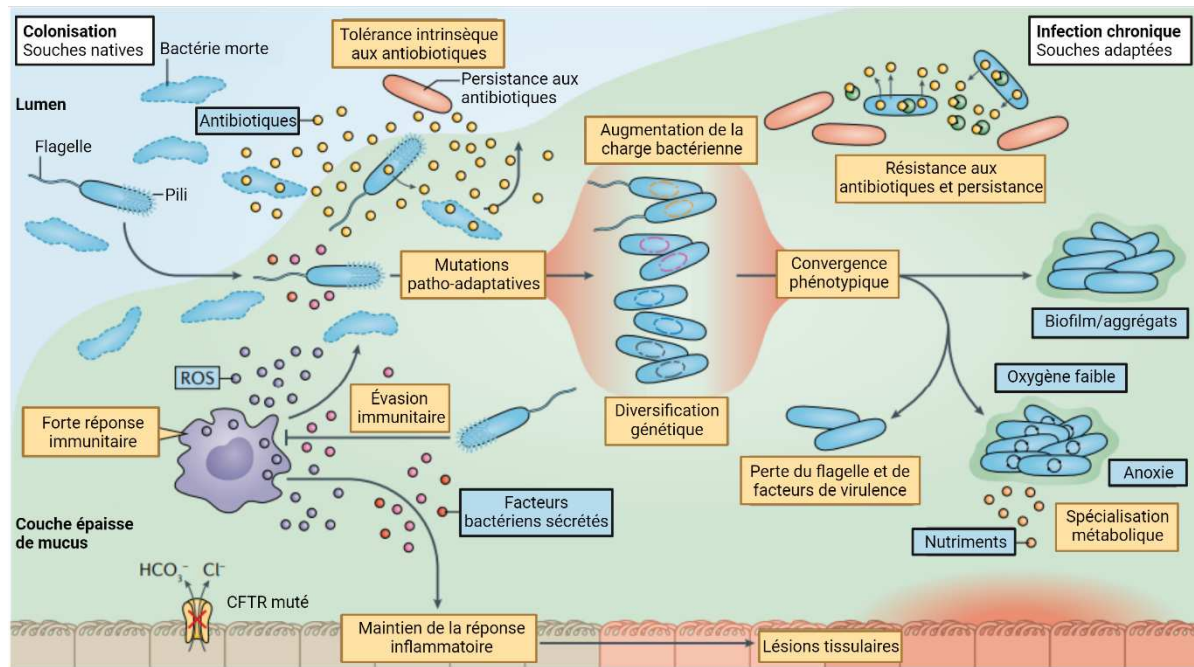


Figure 5 : Adaptations de *Pseudomonas aeruginosa* lors de l'infection des voies aériennes chez un patient CF (adapté de Elio Rossi et al. 2021 (66))

3. Infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de BPCO

a) La BPCO

La BPCO est une maladie chronique inflammatoire des bronches. Selon l'OMS (2016), cette pathologie touche 65 millions de personnes et a été la cause d'environ 3 millions de décès dans le monde en 2015. Elle est actuellement la quatrième cause de mortalité mondiale et il est estimé qu'en 2030 la BPCO deviendra la troisième cause de mortalité mondiale (68). En Europe, 300 000 personnes décèdent de cette pathologie chaque année, et 5 à 10% de la population est touchée (69). En France, il y a 3,5 millions de personnes atteintes, soit 6 à 8% de la population de plus de 45 ans. Cette pathologie, présentant une évolution lente, est encore largement sous diagnostiquée (69,70). Les symptômes sont une toux chronique, une dyspnée et

des expectorations. Des emphysèmes pulmonaires sont également observés. De plus, les patients sont plus sensibles aux infections pulmonaires et connaissent de nombreuses périodes d'exacerbations où leurs symptômes s'intensifient (69). Chez une personne saine, l'épithélium respiratoire produit des molécules de défense contre ses infections, mais chez les patients BPCO, leur production est altérée. Il existe quatre facteurs de risque pouvant favoriser l'apparition de la BPCO, le plus important étant le tabagisme qui représente 80% des cas en Europe. La pollution de l'air, les maladies respiratoires de l'enfance (comme l'asthme) (70) ou encore une composante génétique peuvent aussi favoriser le développement de la pathologie. La BPCO se traduit par un épaississement des parois via l'atrophie des muscles lisses combiné à une hypersécrétion de mucus (figure 6).

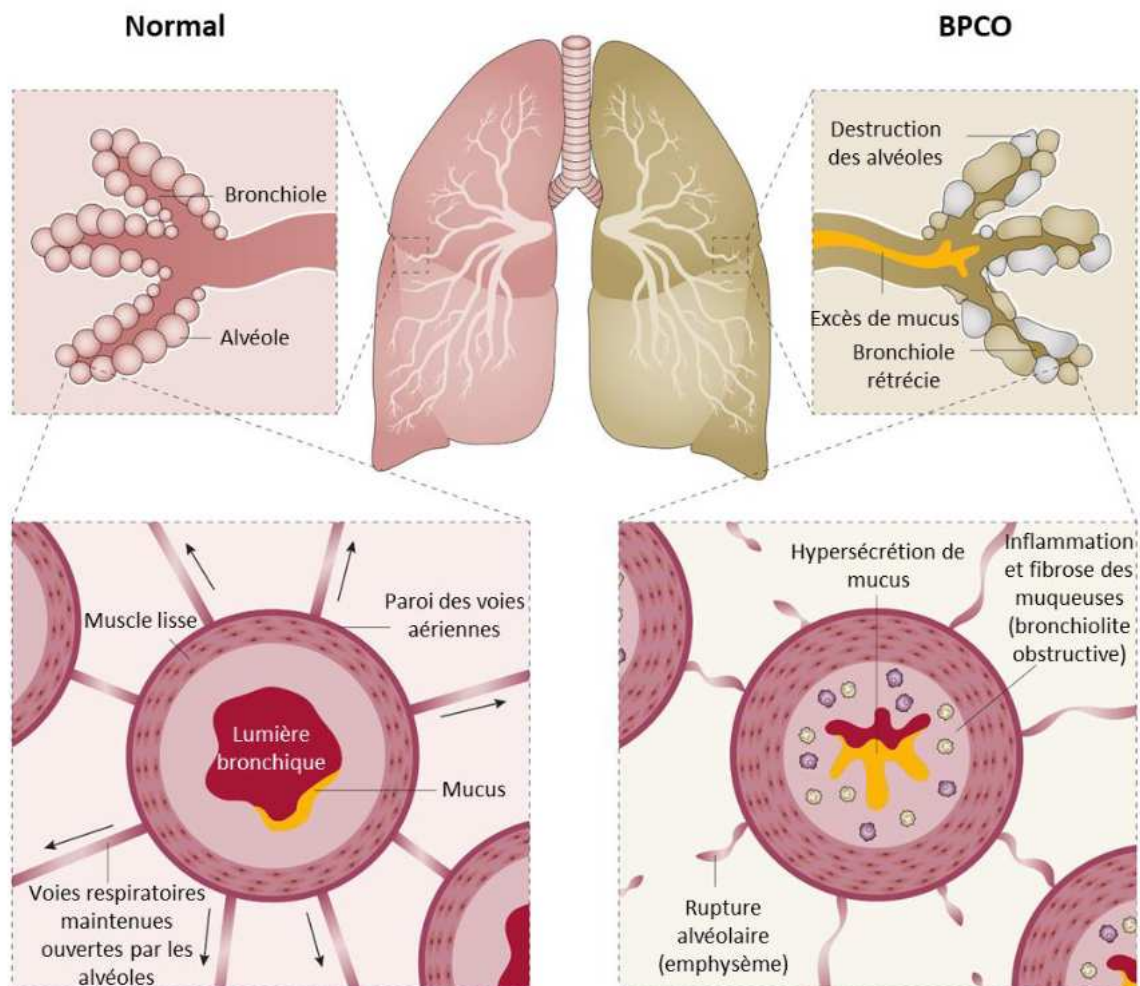


Figure 6 : Représentation schématique de l'impact de la BPCO sur les voies aériennes (adapté de Barnes PJ. et al. (71))

L'inflammation du tissu pulmonaire engendre des perturbations cellulaires et des anomalies fonctionnelles. Deux processus pathologiques sont impliqués. Le premier est le remodelage des voies aériennes induisant une obstruction bronchique et une fibrose péribronchique. L'obstruction bronchique est provoquée par une surproduction de mucus ainsi qu'un manque de clairance mucociliaire. La fibrose péribronchique favorise le dépôt de matrice autour des voies aériennes. Le deuxième processus est l'emphysème dû à la destruction du parenchyme pulmonaire (72).

Chez les patients BPCO, il y a plusieurs remaniements pulmonaires car les capacités de réparation et de régénération de l'épithélium respiratoire après lésion sont altérées. Cette pathologie va entraîner des réponses inflammatoires anormales en réponse à la fumée de cigarette qui peuvent induire une perte des jonctions épithéliales entraînant une perte des contacts cellule/cellule chez les patients BPCO (73). Les cellules basales perdent leur capacité à se différencier et prolifèrent, provoquant une diminution des cellules ciliées qui ne remplissent plus leurs fonctions dans l'épithélium respiratoire. De plus, la fumée de cigarette réduit le nombre de cellules ciliées, induit le rétrécissement des cils (74) et altère leur fonctionnement. Par ailleurs, la composition du mucus est modifiée (48,73), altérant son rôle en tant que barrière physico-chimique. Le dernier remaniement est l'élargissement des espaces alvéolaire avec la destruction des parois par les métalloprotéinases matricielles (MMPs) 1-8-9 et 13. Ce sont des protéases qui peuvent modifier la matrice extracellulaire (MEC).

b) Infections chez les patients BPCO

Chez les patients BPCO, les infections à *P. aeruginosa* représentent 5 à 10% des exacerbations mais est d'autant plus prépondérante au fur et à mesure des stades d'avancés dans la gravité de la maladie (75). C'est le second microorganisme le plus courant retrouvé chez les patients (76). Il est retrouvé dans 4 à 15% des expectorations de patients adultes en exacerbation. Les cas les plus courants d'infections sont aiguës pour une durée relative d'un mois avant l'élimination de la souche (77).

Des infections chroniques ont cependant été décrites comme étant comparables à celles rencontrées chez les patients CF. En effet, les souches présentent dans ce cas des phénotypes

mucoïdes comme retrouvés dans la CF (78). Ces infections chroniques sont la conséquence d'une rechute à la suite d'une infection antérieure (79).

4. Infections à *P. aeruginosa* chez les patients sous ventilation mécanique

Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) sont décrites comme des infections du parenchyme pulmonaire chez les patients exposés à une ventilation mécanique invasive pendant au moins 48 h et font partie des pneumonies nosocomiales acquises en réanimation (80). En Europe, l'incidence des PAVM a été estimée à 18,3 pour 1 000 journées de ventilation (81). En France, Santé Publique France estime l'incidence des PAVM à 22,67 pour 1 000 journées de ventilation en 2020 (82). Les symptômes observés sont la présence d'un infiltrat nouveau ou progressif, des signes d'infection systémique comme la fièvre, modification des crachats et détection d'un agent infectieux (83).

P. aeruginosa fait partie des bactéries les plus fréquemment retrouvées lors de PAVM (81) et est associée à une mortalité de 13,5% même avec un traitement antibiotique associé (84). En milieu hospitalier, les souches multirésistantes sont nombreuses. La présence de *P. aeruginosa* est favorisée par les nombreuses comorbidités et les matériels médicaux invasifs des patients en soins intensifs. Par exemple, la pose de la sonde endotrachéale pour la mise en place de la ventilation empêche les réflexes de toux, provoque des lésions au niveau de l'épithélium de la trachée, diminue la clairance mucociliaire ce qui forme un terrain favorable pour la colonisation par *P. aeruginosa* et la formation de biofilms. (85).

Chapitre 3 : Porine OprD et résistance aux carbapénèmes

P. aeruginosa est naturellement résistant à de nombreux agents antimicrobiens par le fait qu'il présente une membrane externe peu perméable (1/100 de la perméabilité de la membrane de *E. coli*), de l'expression de nombreuses pompes d'efflux diminuant la concentration intracellulaire de nombreux antibiotiques, mais également grâce à la présence d'une β -lactamase chromosomique AmpC (86).

I. Les porines chez *P. aeruginosa*

Les porines sont des protéines retrouvées dans la membrane externe. Elles jouent un rôle important chez les bactéries à Gram négatif car elles permettent le passage de composés hydrophiles au travers de la membrane externe phospholipidique protectrice et imperméable à ces composés. Ainsi, les porines assurent les imports de diverses molécules telles que les nutriments essentiels à la survie bactérienne, comme les sucres ou les AA, mais également certains antibiotiques (figure 11) (87,88).

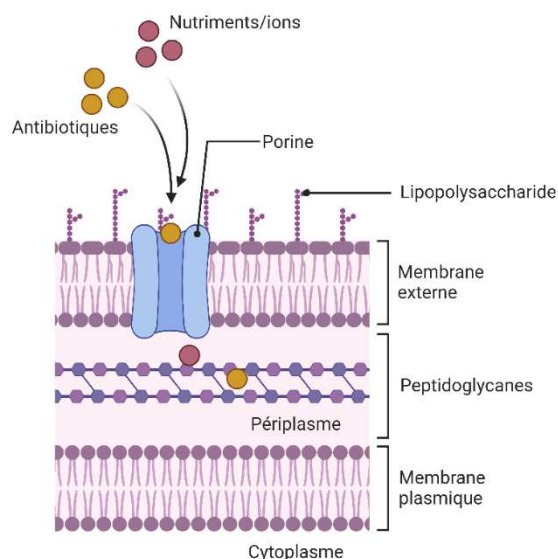


Figure 7 : Schéma d'une porine chez *P. aeruginosa* (fait avec biorender.com)

Les porines sont composées de feuilletts β amphiphiles avec une alternance de régions hydrophiles orientées vers le canal et hydrophobes vers la membrane. Les feuilletts sont reliés

par des boucles (*loops*) et la forme du canal est due à l'enroulement des feuillets sur eux-mêmes. Les porines sont majoritairement trimériques avec l'assemblage de 3 canaux (figure 12) (87,89).

Tableau 1 : Liste des porines de *P. aeruginosa* associées à leur fonction, leurs régulateurs et facteur sigma (*adapté de Chevalier et al. (90)*)

		Gène	Fonction	Antibiotiques	Régulateurs	Facteurs sigma	
Famille des OprD		<i>oprB</i>	Entrée du glucose	-	Anr, GltR	RpoS, SigX	
		<i>oprB2</i>	Entrée du glucose	-	-	-	
		<i>oprF</i>	Structure de membrane, formation de biofilm, adhérence cellules hôte, <i>quorum sensing</i> , entrée d'ions, sucres, et de β-lactamines (sauf carbapénèmes)	-	AmpR	AlgU, SigX, RpoS	
		<i>oprG</i>	Entrée putative du Fe ²⁺	-	Anr	SigX, FecI	
		<i>oprH</i>	Stabilisation de la membrane externe	-	PhoP-PhoQ, BrlR, BqsR, CarR	RpoS, FecI, SigX	
		<i>oprO</i>	Entrée des polyphosphates	-	PhoB, TctD	RpoH, RpoS, SigX	
		<i>oprP</i>	Entrée du phosphate	-	PhoB, TctD	RpoH, RpoS, SigX	
		Groupe OccD	<i>opdB</i>	Entrée de la proline et de l'arginine	-	-	-
			<i>opdC</i>	Entrée de l'histidine et de l'arginine	-	-	SigX, FliA
			<i>opdI</i>	Entrée de l'arginine	-	-	-
			<i>opdJ</i>	Entrée de l'arginine	-	-	-
			<i>opdP</i>	Entrée de glycine-glutamate et de l'arginine	-	-	RpoN
			<i>opdT</i>	Entrée de la tyrosine	-	-	FecI
			<i>oprD</i>	Entrée de l'arginine, la lysine, l'histidine, l'ornithine et supposément le gluconate, entrée de petit peptides	Transport d'imipénème et mérépénème	ArgR, CzcR	RpoN, SigX, FliA
		<i>oprQ</i>	Entrée de l'arginine	-	MexT	RpoS, SigX	
		Groupe OccK	<i>OpdD</i>	-	Transport de mérépénème	-	-
			<i>opdF</i>	Entrée du glucuronate	Transport de carbénicilline, céfoxitine, gentamycine et témocilline	-	FecI
			<i>opdG</i>	-	-	-	-
			<i>opdH</i>	Entrée du cis-conitate et des tricarboxylates	-	TctD	-
			<i>opdK</i>	Entrée de l'acide vanillique et du benzoate	Transport de carbénicilline, céfoxitine, tétracycline et témocilline	-	-
<i>opdL</i>	Entrée du phénylacétate		-	-	-		
<i>opdN</i>	-		-	-	-		
<i>opdO</i>	Entrée du pyrogluconate		Transport de céfotaxime	-	-		
<i>opdQ</i>	Entrée des tricarboxylates		-	NarX-NarL	-		
<i>opdR</i>	-		-	-	-		
<i>oprE</i>	-		-	IHF, OxyR	SigX, RpoN, FecI ₂		

Deux types de porines sont décrites chez *P. aeruginosa* : les porines spécifiques qui permettent l'import d'un panel strictement défini de molécules, et les porines non spécifiques qui assurent l'import de divers substrats. La faible perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* est également liée au fait que ce sont majoritairement des porines spécifiques qui sont exprimées afin de ne sélectionner que les imports nécessaires, favorisant au passage sa résistances aux divers antimicrobiens (90–92).

Parmi les 26 porines retrouvées chez *P. aeruginosa*, OprF est majoritaire. C'est l'homologue de d'OmpA de *E. coli*. Cette porine non spécifique participe principalement à structurer la membrane, mais également à l'import de nombreux nutriments, dont certaines β -lactamines. La famille des porines de type d'OprD regroupe 19 des 26 porines de *P. aeruginosa*. Ces porines se nomment « *outer membrane carboxylate chanel* » et sont caractérisées par un domaine sérine peptidase. Deux sous-groupes la composent : le groupe OccD qui est associé à l'import d'AA basiques, et le groupe OccK pour l'import de molécules cycliques chargées négativement (90,93). Les caractéristiques des 26 porines de *P. aeruginosa* sont détaillées dans le tableau 1.

II. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes font partie des β -lactamines. Le premier carbapénème découvert en 1976 était l'acide olivianique, mais celui-ci était très peu stable (94). Par la suite, la thiénamycine a été isolée en 1979 à partir de *Streptomyces cattleya* (*Streptomyces* MA4297). Du fait de sa stabilité et ses propriétés antibactériennes à large spectre, cette molécule a servi de base pour l'ensemble des molécules carbapénèmes développées par la suite, mais du fait de son rendement faible, cette molécule sera très peu utilisée (95,96). Par la suite, en 1985, l'imipénème s'imposera comme le chef de file de cette classe d'antibiotique car premier carbapénème utilisé pour traiter les infections en clinique. Il reste encore de nos jours un des plus utilisés (94,97,98).

Leur structure est composée d'un noyau β -lactame bicyclique. Le premier cycle est très conservé et est retrouvé dans toutes les molécules de carbapénèmes (99). Le second cycle peut présenter quelques modifications qui conditionnent le spectre d'action antibactérien en fonction des molécules. La structure de différentes β -lactamines est représentée en figure 8 (100).

Le mode d'action des carbapénèmes est similaire aux β -lactamines : les molécules ciblent les protéines liant les pénicillines (PLP) qui permettent la formation de la chaîne polypeptidique du peptidoglycane nécessaire à la structure de la paroi bactérienne (101). Le noyau β -lactame de ces antibiotiques présente une forte homologie structurale avec les motifs D-Ala-D-Ala du peptidoglycane ce qui permet la liaison des β -lactamines aux PLP. L'ouverture du cycle β -lactame permet la liaison irréversible entre le PLP et les carbapénèmes.

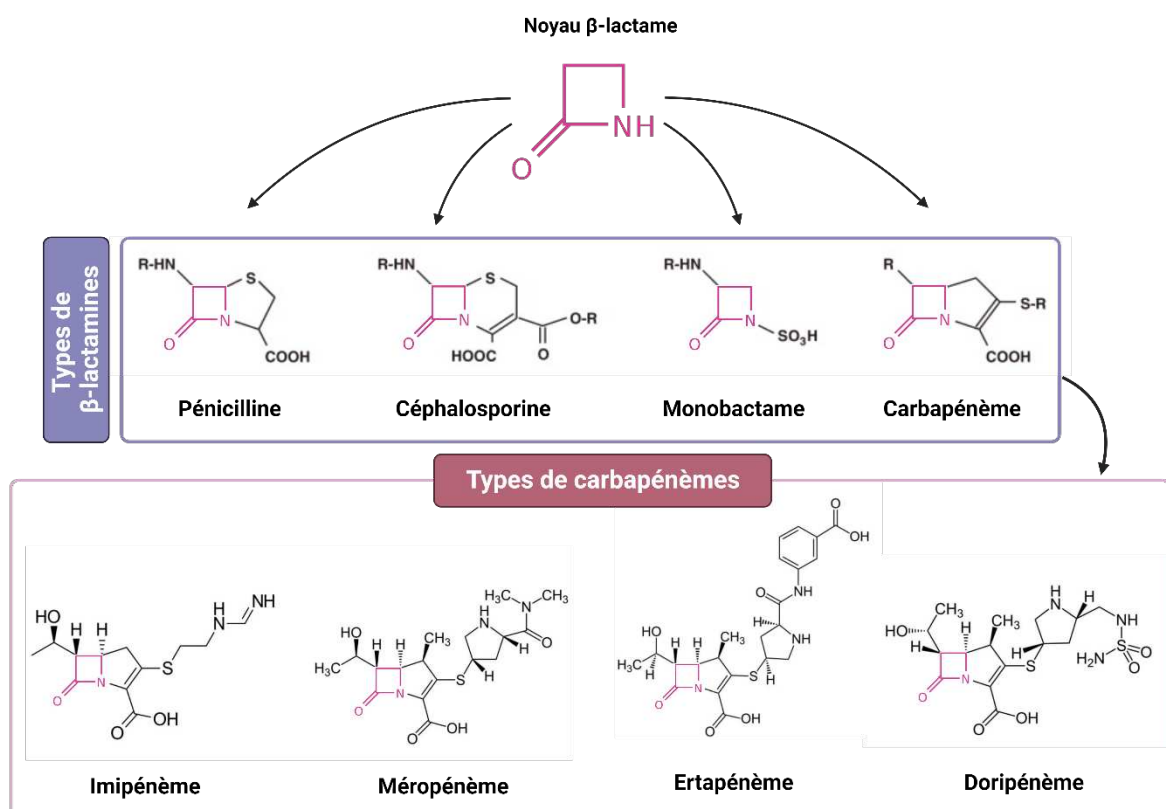


Figure 8 : Structure chimique des différents types de β -lactamines et de carbapénèmes (*adapté de Nordmann et al. (100)*)

Parmi les différentes molécules de carbapénèmes utilisées pour traiter les infections bactériennes, l'imipénème reste le plus courant. Le second est le méropénème, plus efficace contre les bactéries Gram négatif que le premier (102).

III. La porine OprD

Parmi les nombreuses porines retrouvées chez *P. aeruginosa*, la porine OprD, autrement appelée occD1 ou anciennement la porine D2 (103), est la seconde majoritaire. Son nom a été donné à la famille des porines OprD comprenant 19 porines présentant une similarité d'environ

50% (90). Chez PA14 et PAO1, le gène *oprD* mesure 1332 pb et produit une protéine OprD de 48.2 kDa pour 444 AA (104).

La porine OprD est constituée de canaux β formant un trimère et traversant la membrane. Chaque monomère est composé de 18 feuillets β reliés par 9 boucles (loops : L) qui forme un tonneau β . L'intérieur du tonneau OprD contient deux boucles L3 et L7 qui forment un pore très étroit et circulaire d'une taille de 5,5 Å en se repliant vers l'intérieur. Le pore est constitué exclusivement de chaînes polaires et de groupes carbonyles et est chargé négativement. Il reste cependant des résidus d'arginine et de lysine amenant des charges positives dans le canal et permet de guider les substrats le long du canal, c'est la *basic ladder*. La structure de la porine est représentée en figure 9 (105).

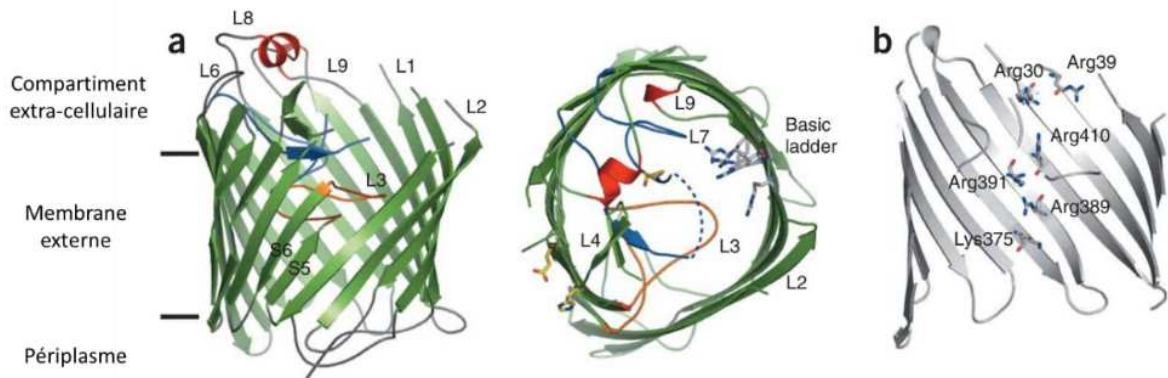


Figure 9 : Structure de la porine OprD (*adapté de Biswas et al. (105)*)

a) Vues de côté (gauche) et du dessus (droite).

b) Basic ladder : ligne conductrice de charges positives pour guider la traversée des substrats

La porine OprD permet le transport d'AA basiques tels que l'arginine, la lysine, l'histidine et l'ornithine, ou encore de petits peptides tels que Ala-Lys, Lys-Ala, Thr-Ser-Lys or Pro-Phe-Gly-Ly (103) mais également le gluconate (106). Elle est également le canal d'entrée de deux antibiotiques de la famille des carbapénèmes : l'imipénème et le méropénème. Le défaut d'expression de la porine OprD entraîne donc une perte de sensibilité aux carbapénèmes (107).

Les imports et l'expression de la porine sont régulés par divers mécanismes résumés en figure 14. Tout d'abord, il existe une compétition entre les différents substrats de la porine. L'entrée des carbapénèmes est donc régulée en fonction de la concentration en AA et peptides

dans le milieu, avec une diminution de l'entrée des carbapénèmes entre 48 à 80% lors d'une concentration forte en AA basiques. De même, il a été décrit une augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les carbapénèmes lors de la croissance de *P. aeruginosa* sur des milieux enrichis en AA basiques (103,107,108).

Dans le cas où les AA basiques représentent la seule source de carbone disponible dans le milieu, la porine OprD se retrouve surexprimée, notamment par la surexpression de l'*Arginine-response regulator* ArgR. Ce phénomène est accompagné d'une diminution de la CMI des carbapénèmes (109).

D'autres éléments peuvent agir sur la régulation de la porine OprD, comme la concentration en métaux dans le milieu. Lorsque la concentration en zinc est élevée, les gènes *czcS* et *czcR* sont surexprimés. Ils régulent ensuite *czcCBA* pour permettre l'efflux des métaux lourds. Ils engendrent également une répression de l'expression du gène *oprD*. On observe également le phénomène avec des fortes concentrations en cuivre dépendant des régulateurs CopR et CopS (110,111). Une diminution de l'expression de la porine OprD peut être également liée aux salicylates via la surexpression de *mexT* (112).

oprD peut également être réprimé via le système PaR/S. Lorsque ce système est dérégulé, il engendre la surexpression de la pompe d'efflux MexXY-OprM et de l'opéron *arnBCADTEF-ugd*, ce qui augmente la résistance à la colistine et à de nombreuses autres molécules antibiotiques généralement utilisées en dernier recours lors d'infection de *P. aeruginosa* multi-résistants (113).

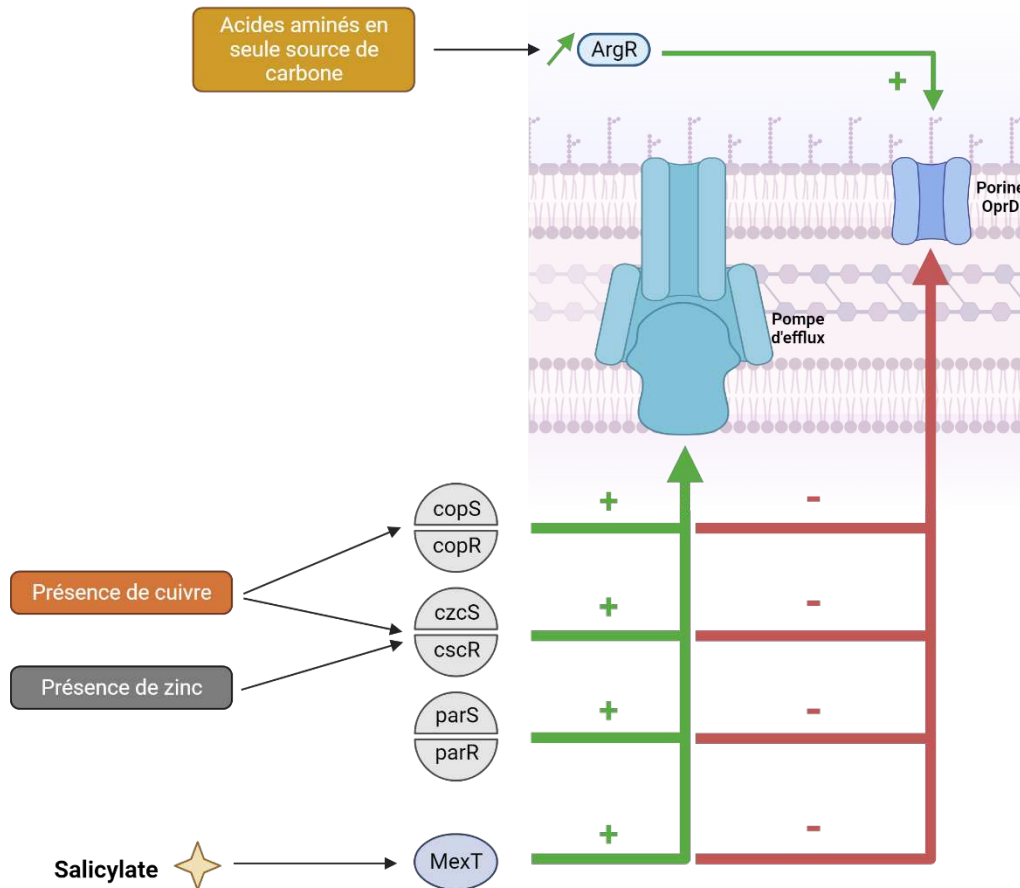


Figure 10 : Mécanismes de régulation de l'expression de la porine OprD (*adapté de Hui Li (107)*)

IV. Résistance aux carbapénèmes via OprD

L'apparition de mutations au niveau du gène *oprD* (insertion, délétion ou substitution d'un nucléotide entraînant le changement d'un acide aminé dans la séquence, la formation d'un codon stop ou le décalage du cadre de lecture) peut être à l'origine de la perte, d'un défaut d'expression de la porine OprD ou d'altérations structurales de la protéine avec un impact sur le passage des substrats comme les carbapénèmes (figure 11). Ces modifications peuvent induire des diminution de sensibilité variable aux carbapénèmes en fonction des souches (114–116). Si cette mutation est couplée à une surexpression de pompes d'efflux, le niveau de résistance peut être élevé (107).

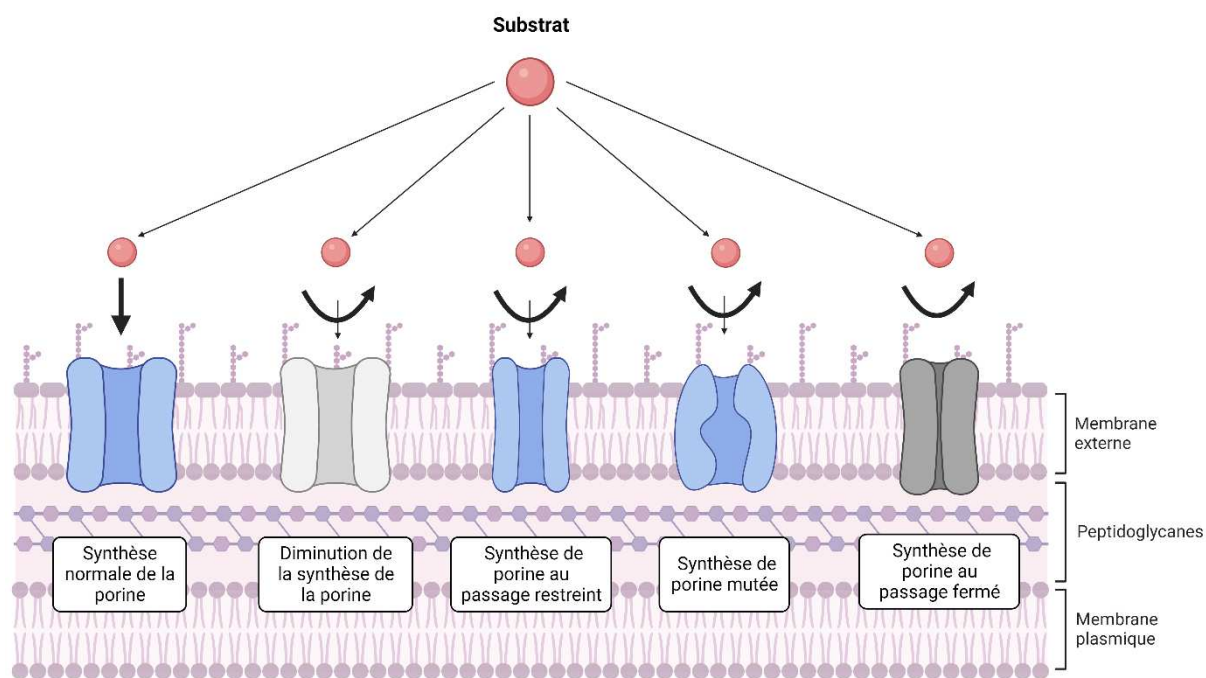


Figure 11 : Représentation schématique des principales altérations de la porine OprD altérant le passage des carbapénèmes au travers de la membrane (*fait avec biorender.com, d'après Jean-Marie Pagès et al. (115)*)

Le cas d'une souche mutante pour la porine OprD a été étudié dans différents contextes dont des modèles de colonisation gastro-intestinale ou de la rate. Avec ces différents modèles, il a été observé une augmentation de la virulence de la souche et un fitness *in vivo* augmenté lors des infections (4,5). Il a également été démontré que de telles souches de *P. aeruginosa* présentaient une virulence augmentée vis-à-vis de l'épithélium de voies aériennes humaines (données personnelles de notre équipe).

Chapitre 4 : Tn-Seq

I. Technologie Tn-Seq

1. Historique

La technologie Tn-Seq repose dans un premier temps sur l'utilisation de transposons. Premièrement appelés « *jumping gene* » ou « éléments transposables », ils ont été découverts en 1944 par Barbara McClintock comme des « éléments de contrôle » chez le maïs. (117). Ces transposons sont des séquences d'ADN mobiles allant de 100 à 10 000 pb (118) et se déplacent dans les génomes via un mécanisme d'excision-intégration autrement appelé « couper-coller » grâce à une transposase. Cette enzyme reconnaît des séquences répétées inversées situées aux extrémités de la séquence du transposon où elle va venir casser l'ADN double brin. Elle va également reconnaître une séquence cible ou une conformation de l'ADN spécifique avec laquelle elle va venir interagir afin d'intégrer le transposon (figure 12) (119,120).

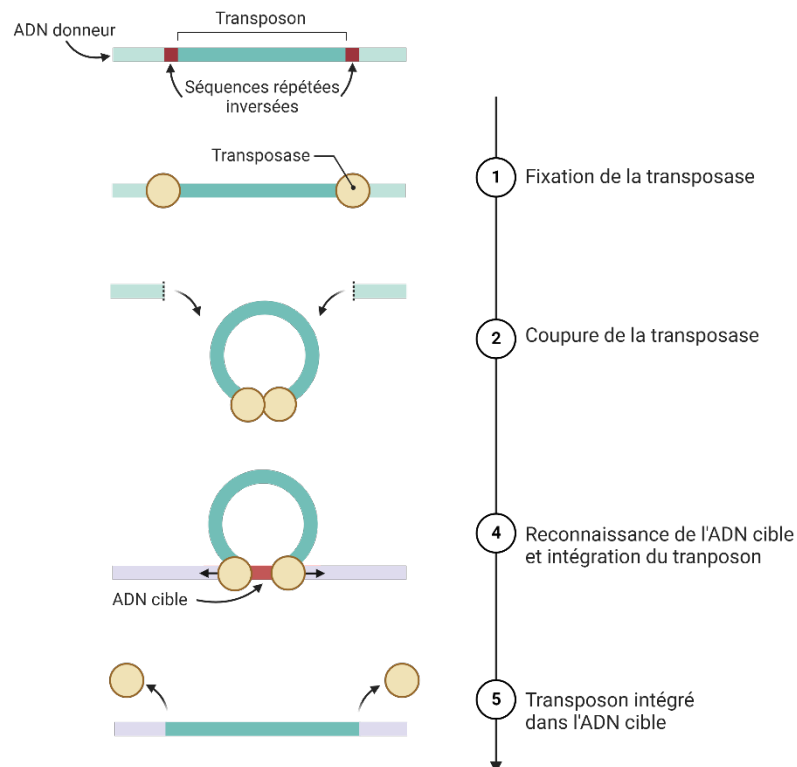


Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme "couper-coller" d'un transposon (adapté de HL. Levin et JV. Moran (120), fait avec biorender.com)

Dans les années 70, les transposons commencent à être utilisés pour manipuler les génomes bactériens dans diverses applications (isolation de mutants, construction de souches, etc.) (121). L'utilisation de banques de mutants à transposon s'est également répandue pour étudier l'expression et la fonction de gènes, la mutagenèse insertionnelle ou encore les gènes essentiels chez les bactéries (122–125).

2. Principe du Tn-Seq

Le Tn-Seq (*Transposon Sequencing*) est une méthode qui allie le séquençage haut débit et la mutagenèse par transposon. Elle utilise une banque de mutants à transposon pour laquelle l'insertion de ce dernier se fait de manière aléatoire et unique dans le génome bactérien, ce qui induit l'inactivation du gène dans lequel il s'insère. Cela permet l'obtention d'un grand nombre de mutants différents. Pour ce type de banques de mutants, c'est un transposon de type *mariner* qui est utilisé. Il s'insère dans les sites Thymine-Adénine (TA). La méthode la plus simple pour la réalisation des banques est l'utilisation d'une conjugaison bactérienne (126). La réalisation des banques est représentée en figure 13.

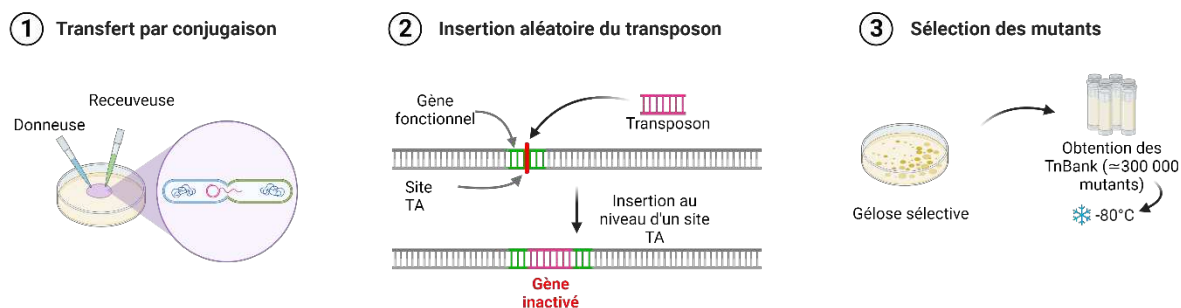


Figure 13 : Réalisation d'une banque de mutants à transposon de type mariner (*fait avec biorender.com*).

Les banques ainsi construites peuvent être testées dans différentes conditions. Le séquençage des régions adjacentes à l'insertion du transposon permet d'identifier et quantifier les gènes inactivés retrouvés après l'utilisation de la banque. Les gènes ainsi retrouvés permettent de déterminer plusieurs éléments : les gènes qui sont favorables à la survie de la bactérie dans la condition lorsqu'ils sont fonctionnels seront peu retrouvés dans les résultats de séquençage, les gènes qui à l'inverse sont défavorables à la bactérie seront surreprésentés. Les gènes qui eux ne seront pas retrouvés en séquençage sont eux les gènes dits « essentiels ». En

effet, l'insertion du transposon dans ces gènes entraînent une perte de viabilité de la bactérie et donc la perte du mutant (127).

Les utilisations du Tn-Seq sont variées : étude du fitness en fonction de conditions données, identification de gènes essentiels/potentiels nouvelles cibles thérapeutiques, implication des gènes dans la résistance, interactions entre les gènes, etc. (4,23,128–130).

II. Gènes essentiels chez *P. aeruginosa*

Un gène est défini comme essentiel lorsqu'il est indispensable à la survie de la bactérie, à son développement dans une condition. Ce sont les gènes qui seraient suffisants pour maintenir une forme de vie cellulaire fonctionnelle dans les conditions les plus favorables (131,132). De plus, comme explicité précédemment (Chapitre 1, III.), il existe deux catégories pour les gènes essentiels : ceux classés dans le « core genome » considérés comme les gènes essentiels à l'ensemble des organismes dans tout type de milieu, et ceux classés dans le génome accessoire dont l'essentialité va dépendre du milieu et/ou de la souche dans lesquels ils sont retrouvés (133). La détermination des gènes essentiels chez des souches bactériennes fortement pathogènes avec des possibilités de traitements limités pourrait permettre la mise en lumière de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques (134), notamment les gènes essentiels accessoires retrouvés dans des conditions d'infection.

Un de ses pathogène est *P. aeruginosa*. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont été menées dans le but de déterminer ses gènes essentiels. La première date de 2003 chez PAO1 par Jacobs *et al.* (122). Depuis, de nombreuses autres études ont été réalisées, notamment via l'utilisation du Tn-Seq. Un récapitulatif des différentes études portant sur l'ensemble des gènes essentiels retrouvés chez des souches de *P. aeruginosa* est indiqué dans le tableau 2. Certaines ont déterminé des gènes essentiels pour des conditions bien spécifiques, comme par exemple dans le cas de résistance à la tobramycine (129), ou encore dans le cas de la formation de biofilms (135). Malgré des conditions similaires (souches, milieux), les listes de gènes retrouvées varient en nombre et en contenu (115 gènes essentiels seulement retrouvés communs aux listes de Liberati *et al.* (2006), Skurnik *et al.* (2013) et Poulsen *et al.* (2019) pour PA14 en milieu LB). Une des raisons pour laquelle ces différences peuvent être observées est l'utilisation des différents outils bio-informatiques pour l'analyse des résultats de séquençage,

chaque méthode ayant des paramètres variables pour la définition de ce qui est considéré comme un gène essentiel.

Tableau 2 : Récapitulatif des listes de gènes essentiels publié pour *P. aeruginosa*

Dataset	Année	Nombre GE	Souche	Milieu	Référence
Jacobs	2003	~300-400	PAO1	Riche à minimal	(122)
Liberati	2006	335	PA14	LB	(136)
Skurnik	2013	636	PA14	LB	(4)
Turner	2015	314	PA14	BHI Agar	(130)
Lee	2015	314	PAO1	LB	(137)
Poulsen	2019		PA14	LB	(138)
<i>FWER</i>		437			
<i>FDR</i>		596			
<i>TRANSIT</i>		316			
<i>CORE</i>		321	Core pangenome de <i>P. aeruginosa</i>		
<i>Small</i>		93	Intersection de 5 études de pangenomes		

Chapitre 5 : Pantothénate et Coenzyme A

Le pantothénate, qui est aussi connu sous le nom de vitamine B5, est une vitamine hydrosoluble (139). La voie de synthèse du pantothénate est cruciale pour la synthèse de Coenzyme A, un facteur essentiel pour de nombreuses réactions métaboliques (140). Cette voie n'est pas présente chez l'Homme, mais est retrouvée chez de nombreuses bactéries, champignons et autres micro-organismes, ce qui fait d'elle une cible intéressante pour le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes (141,142).

I. Voie de biosynthèse du pantothénate

Le pantothénate a été identifié pour la première fois en 1933 en tant que nutriment essentiel pour les levures. Sa voie métabolique a été déterminée au fil des années, de par la caractérisation des différentes enzymes chez les plantes et les champignons, mais notamment par la création de mutants bactériens pour les différentes étapes de cette voie (140).

Pour l'obtention du pantothénate, deux molécules sont nécessaires : le pantoate et la β -alanine. La voie est représentée en figure 14. Le pantoate est obtenu à partir de la dégradation de l'acide 3-méthyl-2-oxobutanoïque en 2-dehydropantoate par une 3-méthyl-2-oxobutanoate hydroxyméthyltransférase codée par le gène *panB*. Par la suite, le 2-dehydropantoate est dégradé en pantoate par une 2-dehydropantoate 2-reductase codée par le gène *panE*. Pour ce qui est de l'obtention de la β -alanine, elle peut être obtenue par plusieurs intermédiaires dont le L-aspartate via une aspartate alpha-decarboxylase codée par le gène *panD*. Le pantoate et la β -alanine sont, par la suite, associés par une pantoate-- β -alanine ligase, également connue sous le nom de pantothénate synthétase, codée par le gène *panC* pour former le pantothénate (143–145). Le gène *panC* est constitué de 851 pb pour un poids moléculaire de 30.8 kDa (146). Sa structure est relativement conservée entre les diverses espèces. La protéine présente deux domaines : un domaine N-terminal contenant la cavité du site actif et un domaine C-terminal qui agit comme un couvercle pour cette cavité (140).

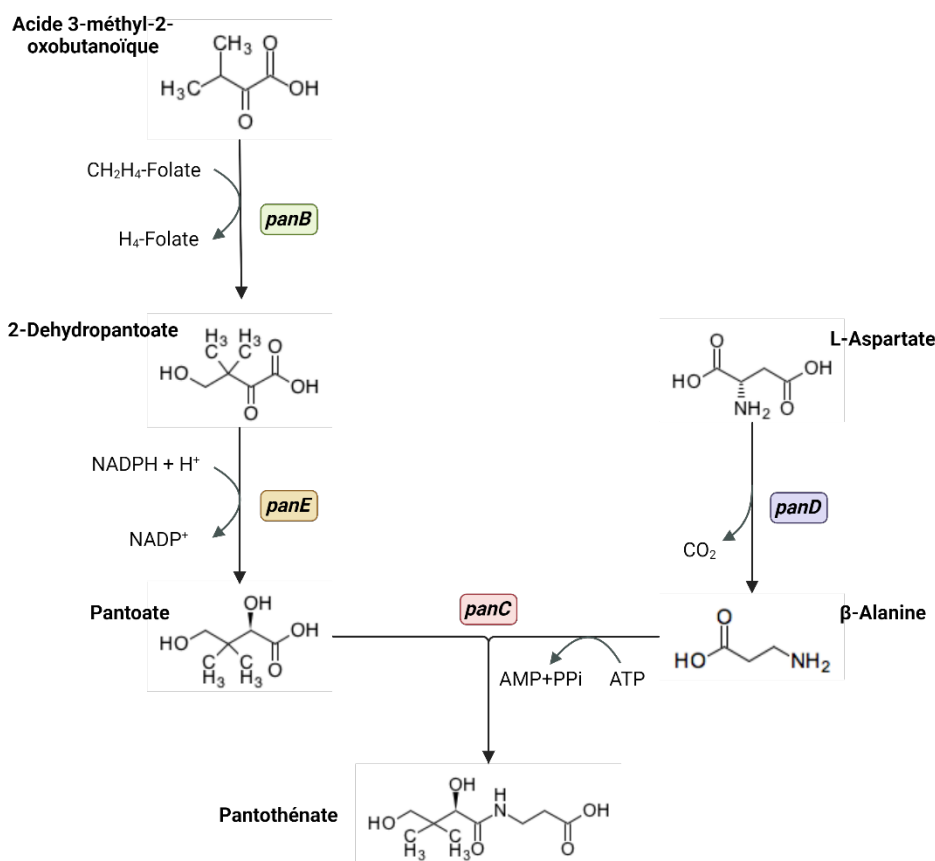


Figure 14 : Voie de biosynthèse du pantothénate chez *P. aeruginosa* (fait avec biorender.com)

II. Voie de biosynthèse du Coenzyme A

Le Coenzyme A a été identifié en 1946 par Fritz Lipmann (147). Il est important dans la synthèse des acides gras (SAG) et leur oxydation, mais également dans l'oxydation du pyruvate dans le cycle de Krebs. Il a été déterminé qu'environ 4% des enzymes connues l'utilisent en tant que substrat (148).

Sa biosynthèse nécessite de la cystéine, du pantothénate et de l'ATP. À partir du pantothénate, 5 étapes sont nécessaires. Dans un premier temps, le pantothénate est transformé en 4-phosphopantothénate par une pantothénate kinase codée par le gène PA14_08630. Par la suite, il est couplé à une L-cystéine par une phosphopantothénoylcystéine décarboxylase/phosphopantothénate synthase bifonctionnelle codée par le gène *coaC* pour

obtenir du 4-Phosphopantothénoylcystéine. Cette enzyme médie également l'obtention de 4-Phosphopantothéine. Cette molécule est ensuite transformée par une phosphopantetheine adenylyltransferase, codée par le gène *coaD*, pour l'obtention de dephospho-coenzyme qui est finalement réduit en Coenzyme A grâce à une dephospho-CoA kinase codée par le gène *coaE* (143,149). L'ensemble de ses réactions sont représentées en figure 15.

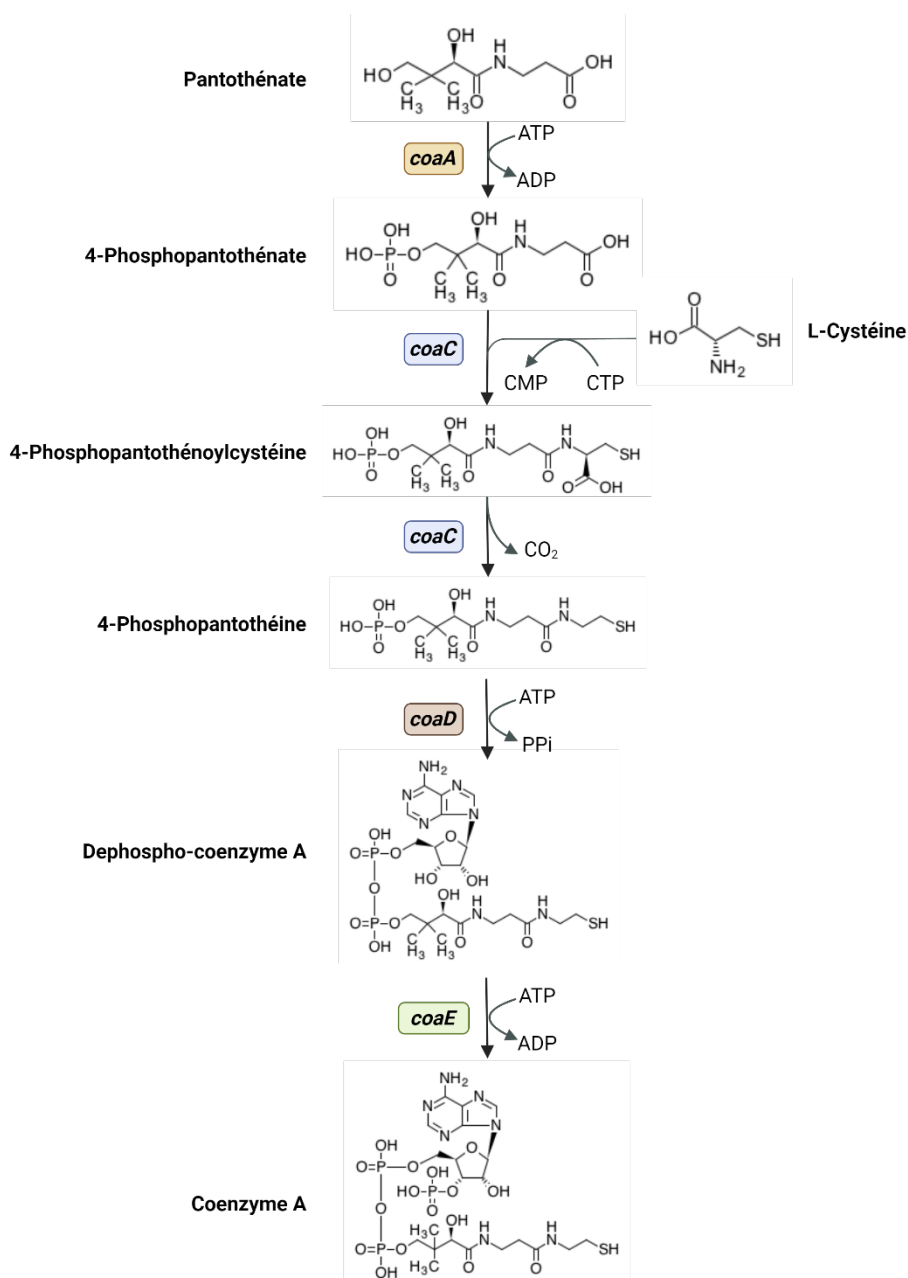


Figure 15 : Voie de biosynthèse de Coenzyme A à partir du pantothénate chez PA14 (fait avec biorender.com)

Le Coenzyme A est présent sous plusieurs formes dans la cellule : sous forme libre, ou bien sous forme thioester acyl-S-CoA. C'est le groupe sulfhydrile (-SH) qui est le site fonctionnel de cette molécule. Il permet d'activer des groupes carboxyles sous la forme d'un dérivé thioester acyl-CoA. Les thioester CoA permettent un transfert facilité des acyls (147). Les divers dérivés thioester sont l'acétyl-CoA, succinyl-CoA (impliqués dans le cycle de Krebs), le malonyl-CoA (impliqué dans la synthèse des AG et dérivé de l'acétyl-CoA) ou encore le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA (150–152).

III. Impact des modulations des voies sur les microorganismes

Puisque la voie des pantothénates n'est pas présente chez l'Homme, elle a été l'objet de nombreux travaux. En effet, elle semble être la candidate parfaite pour la mise au point de nouveaux agents antimicrobiens (140,144,149).

Cette hypothèse a été mise à mal avec l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs dérivés de la β -alanine de la pantothénate synthase qui ne montrait aucun effet sur la croissance bactérienne *in vitro*, concluant qu'une stratégie de ce genre était inefficace comme agent antimicrobien (153). La plupart des travaux publiés se concentrent cependant uniquement sur l'activité de molécules analogues (154). (155) Pourtant, il a été démontré récemment que la synthèse de CoA était essentielle au stade tachyzoïte chez *Toxoplasma Gondii* et a été proposé comme une cible thérapeutique pour lutter contre la toxoplasmose.(155).

Ainsi, le fait de cibler la voie de synthèse du pantothénate et/ou du Coenzyme A à des fins thérapeutiques est encore une piste très discutée dans la littérature.

Chapitre 6 : Acides gras

I. Classification des acides gras

Les lipides regroupent une grande variété de composants et sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans des solvants organiques. Cette famille regroupe 8 classes de molécules que sont les acides gras (AG), les glycérolipides, les glycérophospholipides, les stérols, les sphingolipides, les prénols, les glycolipides et les polykétides (156,157).

Les AG sont les constituants clé des lipides. Ils sont constitués de chaînes d'hydrocarbones pouvant être plus ou moins longues. On distingue 4 catégories d'AG en fonction de leur longueur : moins de 6 carbones, ce sont les AG à petite chaîne ; de 6 à 12 carbones, des AG à chaîne moyenne ; de 13 à 21 carbones, des AG à longue chaîne et au-delà de 22 carbones, ce sont des AG à très longue chaîne (158). Ils sont également catégorisés en fonction de leurs saturations. Les AG insaturés n'ont pas de doubles liaisons dans leur structure, contrairement aux AG saturés qui présentent une double liaison, ils sont alors dits monoinsaturés, ou plusieurs doubles liaisons, dit poly-insaturés (159).

II. Voie de biosynthèse des acides gras

Les AG produits par l'ensemble des organismes vivants servent à diverses structures cellulaires, comme la structure des parois cellulaires, de membranes, la modification de protéines, le stockage d'énergie ou encore divers métabolites (160).

La synthèse des AG débute avec l'acétyl-CoA récupéré du cycle de Krebs via la conversion du citrate en oxaloacétate (161). L'allongement de la chaîne des AG passe par l'ajout de malonyl-CoA et d'acétyl-CoA comme les deux premiers atomes de carbone de la synthèse *de novo* des AG. L'ACP (protéine porteuse d'acyl) a un rôle central dans la synthèse des AG car elle transporte les molécules et permet les réactions d'élongation et de synthèse. Elle interagit

avec de nombreuses enzymes de la voie. La voie de synthèse des AG chez PA14 est représentée en figure 16.

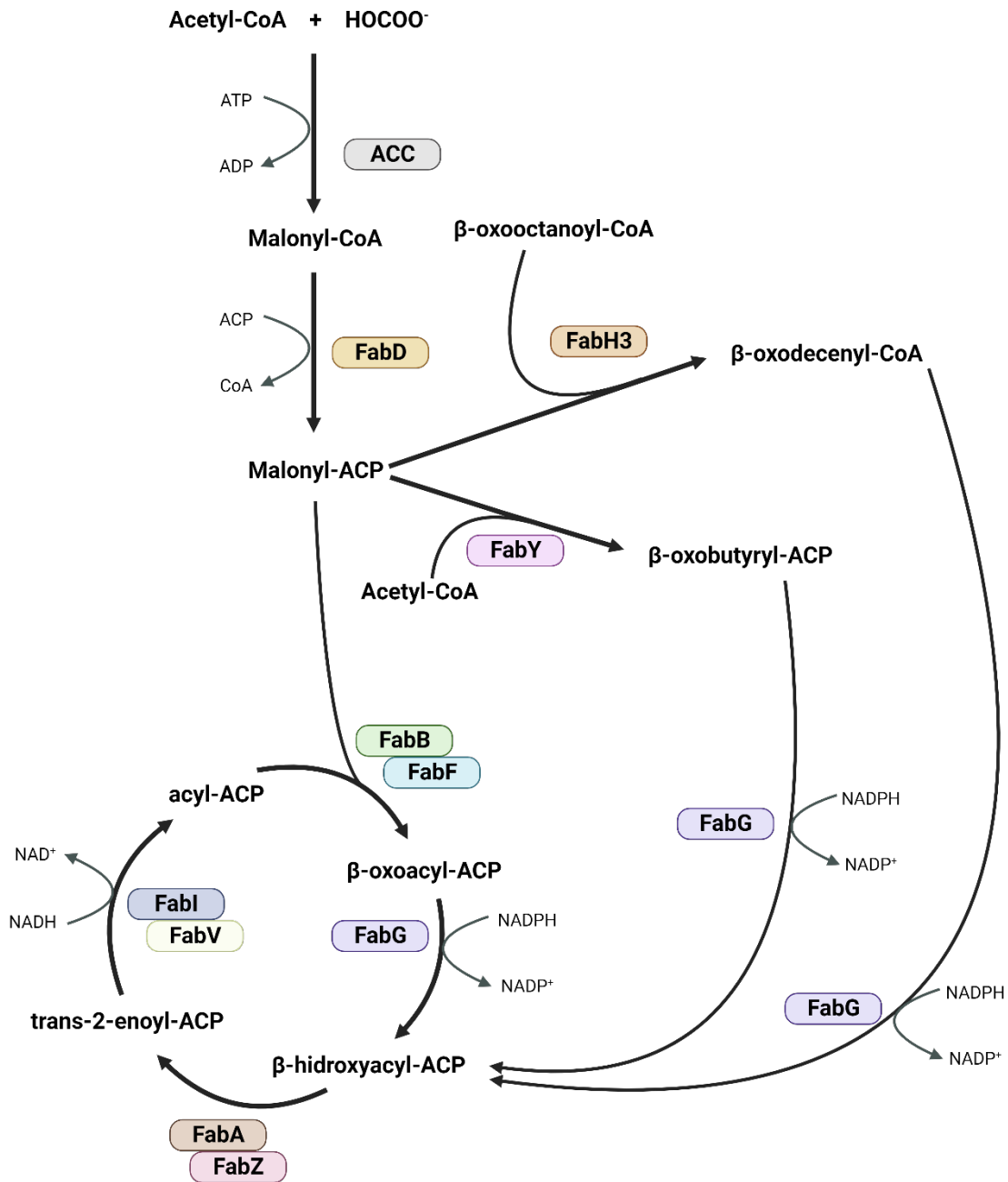


Figure 16 : Voie de synthèse et oxydation des acides gras (*adapté de AL. Boechat (162), fait avec biorender.com*).

Dans un premier temps, l'acétyl-CoA est métabolisé par l'acétyl-CoA carboxylase (codé par le gène *acc*) pour obtenir du malonyl-CoA (163). Le malonyl-CoA synthétisé réagit avec l'ACP pour former le Malonyl-ACP via l'enzyme malonyl-CoA-ACP transacylase codée par le gène *fabD*. Suivent ensuite 4 étapes :

1. L'« initiation » où le malonyl-ACP est transformé en β -oxoacyl-ACP par l'enzyme 3-oxoacyl-ACP synthase codée par le gène *fabB*.
2. La « réduction » où le β -oxoacyl-ACP est réduit en 3-hydroxyacyl-ACP par la 3-ketoacyl-ACP reductase codée par le gène *fabG* (164).
3. La « déshydratation » où le 3-hydroxyacyl-ACP est déshydraté en trans-2-enoyl-ACP par la 3-hydroxydecanoyl-ACP déshydratase codée par le gène *fabA* et/ou via le gène *fabZ* qui code pour une (3R)-hydroxymyristoyl-ACP déshydratase (165).
4. La seconde « réduction » pour obtenir la fin d'élongation de l'AG via une trans-2-enoyl-CoA reductase codée par *fabV* avec une NADH-dépendent enoyl-ACP reductase codée par le gène *fabI* (166).

Cette cascade de réaction est répétée un nombre variable de fois pour l'obtention d'AG plus ou moins longs (160).

Le malonyl-ACP peut également être groupé à un acétyl-CoA pour former un β -oxobutyryl-ACP via l'action d'une β -acetoacetyl-acyl carrier protein synthase codée par *fabY* (167). Le malonyl-CoA peut également former avec un β -oxooctanoyl-CoA du β -oxodecenyl-CoA. Dans les deux cas, la molécule sera ensuite réduite en 3-hydroxyacyl-ACP par la 3-ketoacyl-ACP et poursuivra le cycle décrit avant.

III. Acides gras et structure de membrane

1. Rôle des acides gras dans la structure de membrane

Chez les procaryotes, le rôle de la membrane cellulaire est de protéger les microorganismes du milieu extérieur. Ainsi, la survie bactérienne dépend grandement du maintien de l'intégrité de cette membrane. Chaque bactérie possède son propre arrangement en AG, mais cette composition peut être modifiée dans certaines conditions pour adapter la fluidité de la membrane, comme lors d'adaptation rapide à l'environnement ou lors de l'inhibition de la croissance qui peut induire des modifications des AG avec des cis-trans isomérisation chez *Pseudomonas* (168).

Les AG sont un élément constitutif des lipides, composant majeur des membranes cellulaires (169). Ils se lient au groupe phosphatidyl des phospholipides ce qui forme la structure basique en deux couches de la membrane (170). Les phospholipides présentent alors un côté

hydrophile avec la « tête » phosphorique, et hydrophobe avec la « queue » en AG. La partie hydrophile est orientée vers l'extérieur de la bicouche, tandis que la partie hydrophobe vers l'intérieur (171). La composition de la membrane définit ses propriétés physico-chimiques. Les AG, du fait de leur longueur et leurs saturations vont ainsi influencer sur la perméabilité et la fluidité de la membrane (172,173).

Les AG saturés ont la capacité de regrouper étroitement leurs molécules pour former des structures rigides ordonnées, tandis que la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons plie la chaîne hydrocarbonée. Une molécule prend donc plus de place et empêche ainsi un regroupement aussi serré que les AG saturés. Plus la membrane est riche en AG insaturés, plus elle sera fluide (174) (Fig. 17).

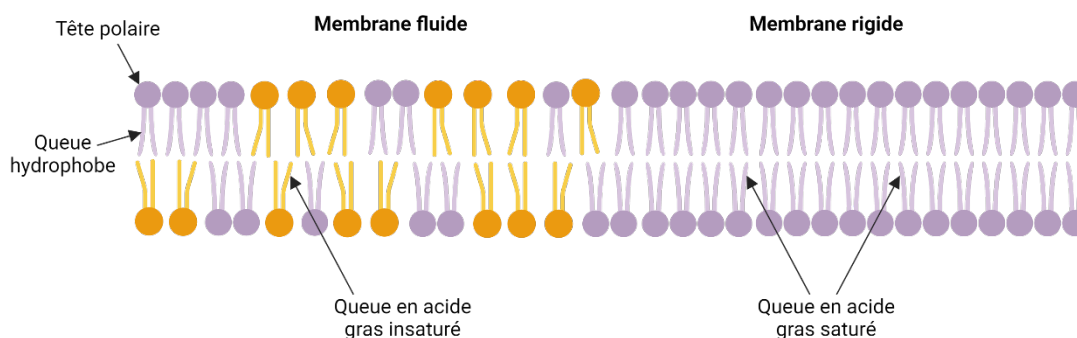


Figure 17 : Modification de la structure de membrane en fonction de la saturation des acides gras (fait avec biorender.com)

2. Régulateur de stress de membrane et synthèse des acides gras

Le facteur sigma ECG SigX a été identifié en 1999 par Brinkman *et al.* (175). Il est impliqué dans l'expression de la porine majoritaire chez *P. aeruginosa*, OprF, dont le gène codant précède *oprF* mais possède également de nombreux autres rôles. Il est impliqué dans la croissance et la survie bactérienne lorsque la croissance est réalisée dans des milieux riches mais également avec une faible osmolarité. Une étude de 2012 démontrait que la transcription d'OprF était majoritairement dépendante de SigX. Dans le cas d'un mutant délété de la porine OprF, sigX était surexprimé lorsque le milieu était d'une faible teneur en NaCl, et avec de fortes

concentrations en sucrose. Ainsi, SigX est associé avec un rôle de réponse au stress de membrane (176).

Par la suite, d'autres travaux ont précisé les différentes fonctions attribuées à SigX. Après étude transcriptomique d'un mutant *P. aeruginosa* délété *sigX*, 307 gènes ont été retrouvés dérégulés. La majorité se trouvait être des gènes codant des protéines de choc thermique, de résistance aux antibiotiques, de métabolisme énergétique, d'import de protéines, sécrétion et mobilité. Ces travaux démontraient que *sigX* était impliqué dans la régulation de la mobilité bactérienne, la formation de biofilm mais également la virulence (177). De plus, il a été également démontré que SigX jouait un rôle dans la synthèse d'AG, puisque la souche de *P. aeruginosa* $\Delta sigX$ présentait une composition de la membrane altérée en AG (178).

L'implication de SigX dans la régulation de la synthèse des AG a également été démontré via une étude protéomique et une étude de l'expression des gènes par RT-qPCR montrant que lorsque *sigX* est surexprimé, une majorité de gènes impliqués dans la synthèse d'AG étaient également surexprimés. En conséquence, cela favorisait la production d'AG à chaîne courte et augmentait leur pourcentage au niveau de la membrane cellulaire et la rendant plus fluide (162).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Résumé

Thèse sur article :

The *panC*-encoded pantothenate synthetase to tackle carbapenem-resistant OprD *Pseudomonas aeruginosa* mutant revealed through Tn-Seq

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa résistant aux carbapénèmes est considéré comme une cible prioritaire par l'OMS pour le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes. Ce pathogène opportuniste est à l'origine de nombreux types d'infection, notamment des pneumonies chez les patients présentant des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose ou la BPCO. *P. aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques et est capable d'acquérir de nouvelles résistances via divers mécanismes. Un de ces mécanismes est la perte de la porine OprD, qui entraîne une résistance aux carbapénèmes, classe d'antibiotiques de dernier recours. Il a été décrit un meilleur fitness *in vivo* et une virulence accrue pour les souches de *P. aeruginosa* avec une perte d'OprD.

Dans le but de trouver des mécanismes pour contrer ces souches résistantes aux carbapénèmes, nous avons identifié les GE spécifiques de PA14 OprD mutant par une approche Tn-Seq en comparaison avec la souche PA14 sauvage (PA14 WT). Dans un premier temps, nous avons validé la qualité de nos échantillons en vérifiant la saturation des banques de mutants à transposon (PA14 Δ *oprD* et PA14 WT), puis nous avons évalué la pertinence de divers outils d'analyse de résultats pour le Tn-Seq. En établissant une liste de GE de référence (gold standard), nous avons comparé les différentes méthodes décrites pour l'analyse de données de Tn-Seq et déterminé que l'utilisation du logiciel FiTnEss était la meilleure option.

De cette manière, nous avons déterminé une liste de 30 GE spécifiques à PA14 OprD mutant pour une croissance en milieu LB. Parmi ces 30 gènes, nous avons choisi de nous focaliser sur deux gènes, *fahA* et *panC* impliqués dans la production d'intermédiaires du cycle de Krebs, voie métabolique centrale.

Dans un premier temps, le caractère essentiel de ces deux gènes a été vérifié biologiquement en tentant de réaliser des délétions chez les souches PA14 WT et Δ *oprD*. Tandis que nous avons obtenu la délétion du gène *fahA* chez les deux souches, il a été

impossible de déléter le gène *panC*. Ces résultats invalident le caractère essentiel supposé de *fahA* pour PA14 OprD mutant. Par la suite, nous avons utilisé une approche CRISPRi pour éteindre l'expression des gènes de façon inductible (arabinose). L'extinction de l'expression de *panC* par CRISPRi a mis en évidence une diminution de croissance en LB pour PA14 Δ *oprD*. Ceci a renforcé notre hypothèse de l'essentialité de *panC*.

Puisque *panC* permet l'obtention de pantothénate, indispensable à la production de Coenzyme A, lui-même nécessaire au cycle de Krebs, nous avons tenté de vérifier si l'extinction d'expression du gène empêchait la compensation via le cycle de Krebs du manque d'import en AA normalement importés par OprD. Les résultats de culture en milieux minimum supplémentés en divers AA ont démontré que les retards de croissance lors de l'inhibition de *panC* ne s'expliquaient pas par les imports de la porine.

Sachant que la porine OprF, majoritaire à la membrane de PA, joue un rôle dans la structure de membrane, nous avons émis l'hypothèse que OprD, qui est la seconde porine majoritaire, pourrait également avoir un rôle similaire. Ainsi, une dérégulation de la synthèse des AG causée par l'inhibition de *panC*, ayant un impact sur la synthèse de Coenzyme A ainsi que le cycle de Krebs, pourrait induire une forte altération de la membrane bactérienne entraînant une perte de viabilité. Nous avons donc quantifié l'expression de deux gènes impliqués dans la réponse au stress de membrane, *sigX* et *cmpX*. Tous deux avaient une expression diminuée chez PA14 Δ *oprD* lorsque l'expression de *panC* était réduite par CRISPRi, laissant penser à une membrane altérée. En complément, nous avons également mesuré l'expression de gènes de synthèse des AG à différents stades de la voie : *fabD* impliqué dans les premières étapes de la voie, et *fabG*, *fabY* et *fabZ*, plus tardifs, participant à l'élongation et l'insaturation des AG. L'ensemble de ces gènes était sous exprimé chez PA14 Δ *oprD* si l'expression de *panC* était inhibée. L'ensemble de ces résultats semble converger vers une altération de la membrane liée à un déséquilibre dans la production d'AG insaturés.

En plus de cela, nous avons également démontré que l'inhibition de *panC* induisait une augmentation du temps d'induction de la mort de cellules bronchiques par PA14 OprD mutant contrairement à PA14 WT. Ceci met en lumière un effet anti-virulent de l'inhibition de *panC*.

L'ensemble de ce travail laisse penser que l'inhibition de la voie de synthèse du pantothénate pourrait être une bonne cible pour le développement de nouveaux antimicrobiens dans le cas d'infection à PA14 résistant aux carbapénèmes induit par la perte de la porine OprD.



New Results

Follow this preprint

The panC-encoded pantothenate synthetase to tackle carbapenem-resistant OprD *Pseudomonas aeruginosa* mutant revealed through Tn-Seq

Cl  op     Van Maele, S  gol     Caboche, Marin Moutel, Arnaud Bonnomet, Sophie Moussal  h, Emilie Luczka, Herve Jacquier, Ana     Muggeo, Thomas Guillard

doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.19.563089>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].



Abstract

Info/History

Metrics

Preview PDF

Abstract

For the World Health Organization, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is a critical priority for which new antimicrobial drugs are needed. Consequently, understanding the underlying mechanisms of resistant bacteria infection will enable the identification of new therapeutic targets. Loss of the OprD porin is the main determinant of resistance to the last resort carbapenem antibiotics and has been described to enhance fitness in vivo and virulence. Transposon sequencing is a high-throughput sequencing technique that makes it possible to identify essential genes (EGs) that may turn out to be therapeutic targets. However, such a strategy has not yet been used for OprD-deficient *P. aeruginosa*. In this study, we identified the EGs specific to PA14 OprD mutant for LB growth and highlighted the panC gene encoding pantothenate synthetase as a promising target. We established a list of 30 EGs of PA14 OprD mutant. Using CRISPRi, we confirmed that silencing panC reduced LB growth, and decreased sigX expression, whose overexpression is associated with membrane fluidity, as well as the expression of genes involved in the fatty acid synthesis (FAS). Taking into account the weakness of PA14 OprD mutant due to an altered membrane consecutive to a decrease in unsaturated FAS in the absence of panC, we showed that silencing panC extended the time of death of human bronchial epithelial cells (16HBE). Overall, our findings highlighted the anti-virulence potential of panC inhibition and shed new light on its inhibition as a target for treating carbapenem-resistant OprD-defective PA lung infections.

Competing Interest Statement

The authors have declared no competing interest.

Copyright The copyright holder for this preprint is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

The *panC*-encoded pantothenate synthetase to tackle carbapenem-resistant OprD *Pseudomonas aeruginosa* mutant revealed through Tn-Seq

Cléopée Van Maele¹, Ségolène Caboche², Marin Moutel¹, Arnaud Bonnomet^{1,3}, Sophie Moussalhi¹, Emilie Luczka¹, Hervé Jacquier⁴, Anaëlle Muggeo⁵, Thomas Guillard^{5*}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, CHU de Reims, P3Cell, U 1250, Reims, France

² Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UAR 2014-PLBS, F-59000 Lille, France.

³ Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT), Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France.

⁴ Département de Microbiologie, Hôpital Mondor Hospital, AP-HP, Université de Paris-Est, Créteil, France; EA 7380 Dynamyc, EnvA, UPEC, Université de Paris-Est, Créteil, France.

⁵ Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, CHU de Reims, Laboratoire de bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière-Parasitologie-Mycologie, P3Cell, U 1250, Reims, France

*Corresponding author.
Inserm UMR-S 1250 P3Cell
45, rue Cognacq-Jay 51092 Reims cedex, France
Fax: +33326784134.
E-mail: tguillard@chu-reims.fr

Number of figures: 6 + 3 supplementary figures

Number of tables: 3 + 6 supplementary tables

Word count of abstract: 239

Number of references: 64

Abstract

For the World Health Organization, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is a critical priority for which new antimicrobial drugs are needed. Consequently, understanding the underlying mechanisms of resistant bacteria infection will enable the identification of new therapeutic targets. Loss of the OprD porin is the main determinant of resistance to the last resort carbapenem antibiotics and has been described to enhance fitness *in vivo* and virulence. Transposon sequencing is a high-throughput sequencing technique that makes it possible to identify essential genes (EGs) that may turn out to be therapeutic targets. However, such a strategy has not yet been used for OprD-deficient *P. aeruginosa*. In this study, we identified the EGs specific to PA14 OprD mutant for LB growth and we established a list of 30 EGs among these, we highlighted the *panC* gene encoding pantothenate synthetase as a promising target. Using CRISPRi, we confirmed that silencing *panC* reduced LB growth, and decreased *sigX* expression, whose overexpression is associated with membrane fluidity, as well as the expression of genes involved in the fatty acid synthesis (FAS). Taking into account the weakness of PA14 OprD mutant due to an altered membrane consecutive to a decrease in unsaturated FAS in the absence of *panC*, we showed that silencing *panC* extended the destruction time of 16HBE airway cells. Overall, our findings highlighted the anti-virulence potential of *panC* inhibition and shed new light on its inhibition as a target for treating carbapenem-resistant OprD-defective PA lung infections.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa (PA) is an opportunistic pathogen known to cause various types of infection. The main one is pulmonary infection, such as pneumonia when associated with respiratory pathologies such as cystic fibrosis (CF) or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (1–3). PA is often found in hospital settings, particularly intensive care units, which favors the presence of multidrug-resistant (MDR) bacteria (4), a growing problem due to the lack of therapeutic choices for treating these infections.

PA is intrinsically resistant to many antibiotics and can acquire resistance upon treatments. For this reason, PA is part of the ESKAPE pathogens (5). The carbapenems are major antibiotics used as last resort treatments to face MDR PA. The lack of functional OprD porin leads to carbapenem resistance and is the most frequent mechanism of resistance to this class of antibiotics (6–8). OprD is collaterally the entry channel for two carbapenems (Imipenem and Meropenem), its first function is the uptake of basic amino acids such as arginine, lysine, histidine and ornithine, or even small peptides (9,10).

Interestingly, an enhanced *in vivo* fitness of OprD PA mutant has been described in the context of gastrointestinal and spleen colonization (11,12). It has also been shown to be more virulent in a mouse model of acute pneumonia (13). However, the mechanism underlying this increased virulence in the absence of OprD has yet to be elucidated. We therefore decided to determine whether *in vitro* gene essentiality could provide clues to tackle such a higher virulent and resistant pathogen.

Transposon Sequencing (Tn-Seq) is a high-throughput sequencing that uses transposon mutant libraries to determine the fitness or essentiality of genes under specific conditions. The use of a mariner transposon that inserts into a thymine-adenine (TA) site only once per bacterium and randomly makes it possible to obtain a very large number of mutants (14). The

78 determination of essential genes (EGs) can lead to the identification of potential new therapeutic
79 targets.

80 In this study, we first propose to evaluate the bioinformatics analysis of Tn-Seq data
81 with data generated on two strains growing on Lysogenic Broth (LB): PA14 wild-type (WT)
82 and PA14 Δ *oprD*. As the regularly-updated TRANSIT software, offering several statistical
83 methods and parameters, is the most popular tool, we decided to evaluate several methods and
84 parameters of the TRANSIT suite. We also evaluated FiTnEss (Finding Tn-Seq Essential
85 genes), a tool developed for dealing with PA Tn-Seq data (15). We introduced a gold standard
86 dataset of EGs for PA14 and used several metrics to compare the different methods. From these
87 Tn-Seq analyses we identified *panC* as a specific essential gene for the OprD mutant. We
88 showed that the lack of import by the OprD porin did not explain the need of *panC* for *in vitro*
89 growth. Nevertheless, we found that *panC* inhibition impacted the fatty-acid pathways
90 indicating a decrease in unsaturated FA synthesis, which and could therefore affect the
91 membrane homeostasis. Eventually, we evidenced that silencing *panC* decreased the virulence
92 of the carbapenem-resistant PA OprD mutant against 16HBE cells and could be a promising
93 therapeutic target.

94

95

Results

Description and quality of the data.

Sequencing was carried out in 2 different runs: samples S1 and S3 on RUN1, samples S1-S2 and S5-S6 on RUN2 leading to 6 samples corresponding to PA14 WT or PA14 Δ *oprD* grown on LB culture media (Table 1). Strains information are listed in table S1.

Table 1: Description of samples used in this study.

RUN	Samples	Strain	Culture medium
RUN1	S1	PA14 Δ <i>oprD</i>	LB
RUN1	S3	PA14 Δ <i>oprD</i>	LB
RUN2	S1	PA14 WT	LB
RUN2	S2	PA14 WT	LB
RUN2	S5	PA14 Δ <i>oprD</i>	LB
RUN2	S6	PA14 Δ <i>oprD</i>	LB

We showed that the quality metrics obtained with BWA (mapper in TPP package of TRANSIT) (16) were very different, being below the recommended thresholds, from those observed with bowtie (17) (Supplementary Table S2 and S3). Although, there are no formal criteria for determining what constitutes a good library and for excluding certain samples (18), a very important metric is density, which should be above 30 % and ideally above 50 %. In our study, density was above 50% for all the samples. The percentage of mapped reads was lowest for sample S6 with around 65% of reads mapped. In addition, sample S6 showed NZ-mean values of 14.4, which ideally should be greater than 50. To identify potential outliers, a correlation matrix (Pearson coefficient) was computed (Supplementary Figure S1). The results showed that correlation coefficients were higher between the same strains. With regards to replicates, the coefficients were lower with sample S6, which was therefore discarded. Finally,

114 we used samples S5_RUN2, S1_RUN1 and S3_RUN1 for the PA14 Δ oprD LB condition and
115 samples S1_RUN2 and S2_RUN2 for the PA14 WT LB condition.

116

117 **Bowtie_HMM and FiTnEss for reliable EGs identification of PA14 in LB**

118 Many previous studies have reported the EGs for several PA strains grown on different
119 culture media (Supplementary Table S4) (11,15,19–21). First, we attempted to provide the
120 minimal set of EGs of PA14 grown in LB, being somehow the gold standard EGs, which are
121 expected to be retrieved in any set of EGs identified. From previous studies, 115 genes
122 (GOLD_115) were common to all studies for PA14 and by intersecting all datasets, we obtained
123 84 genes (GOLD_84) that represented a reduced but reliable list of EGs.

124 To determine which analysis will provide the most reliable set of EGs from our Tn-Seq
125 data, we compared the finely tunable TRANSIT suite with FiTnEss. Based on our GOLD_115
126 and GOLD_84 lists, we compared the EGs obtained from samples S1 and S2 (PA14 WT) using
127 bowtie and BWA with different parameters and normalization. First, for both gold standard lists
128 of EGs, less than 10% of genes were retrieved with BWA using Gumbel and HMM methods
129 whereas 40 to 50% were retrieved with bowtie using either Gumbel or HMM. (Fig. 1A).
130 Interestingly, considering EG and “growth defect (GD) genes, the HMM method identified
131 around 90% of gold standard EGs for both mappers (Fig. 1A). Second, using bowtie with
132 Gumbel or HMM, varying several parameters (see Material and Methods as well as the
133 Supplementary data), we confirmed that Gumbel led to shorter lists of EGs whatever the
134 parameters (Fig. 1B and Fig. S1). Surprisingly, we observed that using the mean read counts
135 with Gumbel increased results by 10%. For HMM, using the default mean read counts was
136 better than using the sum. Using the loess option predicted slightly more genes (194 EG and
137 602 EG+GD with loess option against 184 and 565 without loess option, respectively) but had
138 no impact on the percentage of gold standard EGs retrieved. Third, as normalization of the read

139 counts prevented other sources of variability from being mistakenly treated as real differences
140 in datasets, we tested the several types of normalization proposed by the TRANSIT suite
141 (Totreads, TTR, Nzmean, Quantile, Betageom, Zinfnb and nonorm) for bowtie_HMM. We
142 found the highest amount of (EG + GD) with Quantile (690 and 2815) and Zinfnb (901 and
143 2815) normalization (Fig. 1C), but the number of identified genes were higher and therefore
144 probably contained more false positives (Fig. S4). The default TTR normalization preserved
145 good sensitivity and specificity.

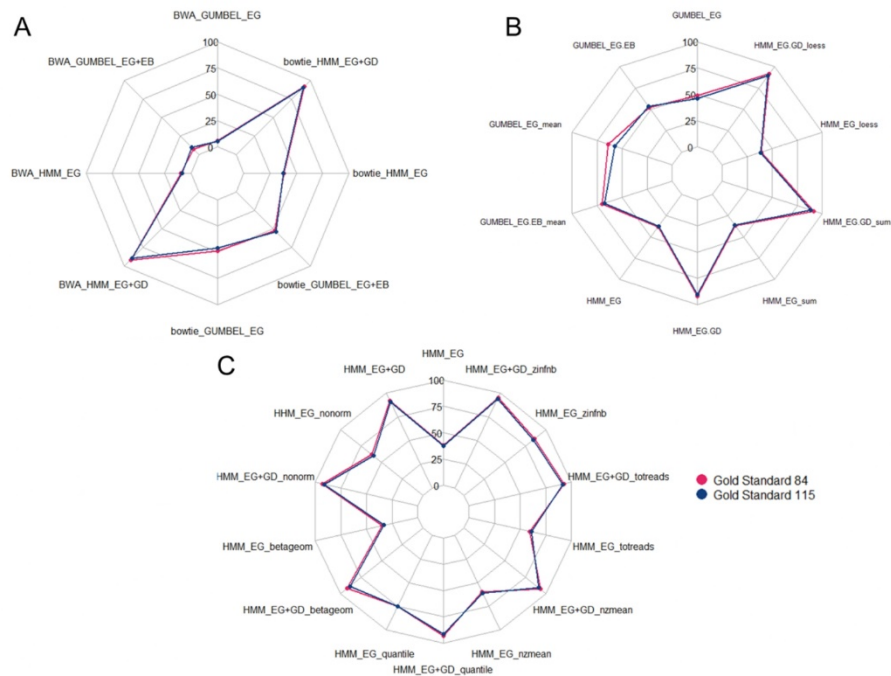


Figure 1. Assessment of Tn-Seq analysis methods. (A) Impact of the mapper on EGs determination illustrated by a radar plot showing the percentage of gold standard EGs identified by each method. (B) Impact of the different software parameters on EGs determination illustrated by a radar plot showing the percentage of gold standard EGs identified by each method (C) Impact of normalization on EGs determination illustrated by a radar plot the percentage of gold standard EGs identified by each method. For each panel: in blue the data set containing the GOLD_84 and in red the GOLD_115 from WT grown in LB. EG = Essential class, EB= Binomial class, GD = Growth Defect class.

146

147 Lastly, we determined the number of EGs identified with bowtie (Gumbel or HMM)
148 versus FiTnEss, which returned a FWER stringent list included in the FDR results (see

Materials and methods section for a description of the statistical methods). As expected from previous results Gumbel identified very few EGs (205 EGs and 274 EGs) and around 50 % of gold standard EGs were present in these sets. HMM produced better results with over 90 % of gold standard EGs identified in the list obtained by considering both EGs and growth defect genes. FiTnEss, even with the stringent list of 358 EGs produced with FWER, contained more than 95 % of the GOLD_84 and 90 % of the GOLD_115 EGs. Reducing stringency with FDR yielded an EGs list of 609 genes containing 100 % of the gold standard EGs (Table 2). FiTnEss was the only method capable of identifying all the expected genes previously identified as essential and appeared to return a reliable list of EGs. Overall, these findings showed that bowtie_HMM and FiTnEss FDR were recommended for our Tn-Seq analysis.

Table 2: Number of EGs identified with Gumbel, HMM and FiTnEss methods.

	Number of EGs	GOLD_84 ^a	GOLD_115 ^a
GUMBEL_EG	205	48,81	46,09
GUMBEL_E+EB	274	52,38	53,91
HMM_EG	184	38,10	37,39
HMM_Gs+GD	565	91,67	90,43
FiTnEss_FWER	358	95,24	89,57
FiTnEss_FDR	609	100,00	100,00

^aThe percentage of the reduced reliable list of gold standard EGs GOLD_84 and GOLD_115.

Identification of the EGs specific to PA14ΔoprD

As FiTnEss produced a list of EGs for one condition, we intersected the set of EGs provided by FiTnEss FDR from PA14 WT and PA14ΔoprD to obtain the specific EGs of the OprD-deficient PA14 strain in LB. In the genes obtained with bowtie_HMM, we identified

166 genes exhibiting statistically significant variability of insertion counts across PA14 WT and
 167 PA14 Δ *oprD* (conditionally EGs) either by three statistical methods (Anova, Resampling and
 168 Zinb) available in the TRANSIT suite to determine, or by intersecting as performed for FiTnEss
 169 (see Material and Methods and Supplementary data for more details).

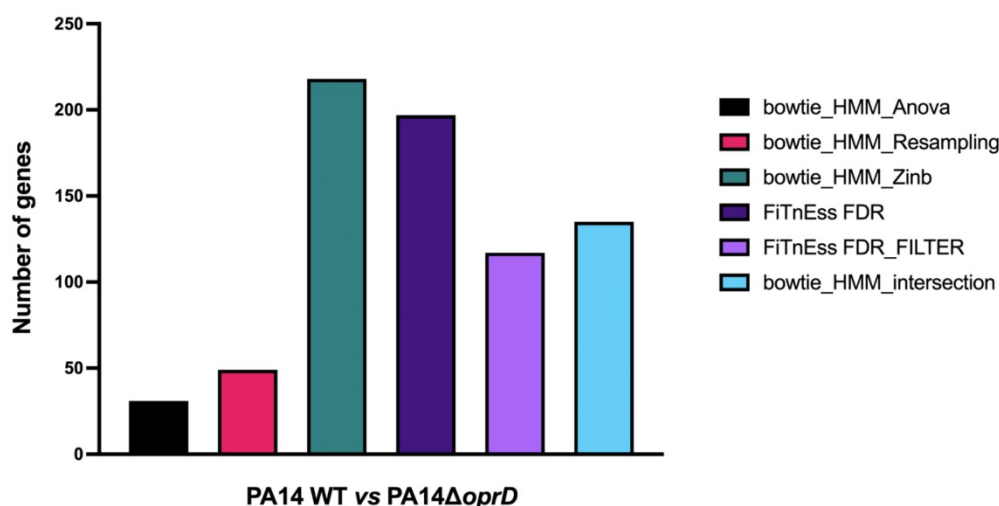


Figure 2. Number of genes conditionally essential in LB for PA14 Δ *oprD* compared to PA14 WT.
 Comparison of the numbers of GEs only in one of the two PA14 strain tested obtained with different analysis methods.

170

171 As intersections might lead to false positive, we filtered out the genes specific to one
 172 condition (WT or Δ *oprD*) that are not classified as non-essential in all samples in the other
 173 condition (Δ *oprD* or WT, respectively). This filter reduced the number of genes for FiTnEss
 174 but did not impact the number of genes obtained with bowtie_HMM. The total of conditionally
 175 EGs for PA14 Δ *oprD* and PA14 WT were 31 (bowtie_HMM_Anova), 49
 176 (bowtie_HMM_Resampling), 218 (bowtie_HMM_Zinb), 197 (FiTnEss_FDR), 117 (FiTnEss
 177 FDR_FILTER) and 135 (bowtie_HMM_intersection). Only 3 genes were common between all
 178 the methods. The methods based on intersection (FiTnEss_FDR, FiTnEss FDR_FILTER and
 179 bowtie_HMM_intersection) shared more EGs among the dataset than those obtained with the

180 statistical methods. By focusing on the shortest list of 117 EGs found by FiTnEss FDR_FILTER,
 181 we identified 30 conditionally EGs for PA14 Δ *oprD* vs PA14 WT. As our 84 gold standard EGs
 182 (GOLD_84) were supposed to be essential for all PA strain in any culture medium, we
 183 confirmed they were not included in the aforementioned lists of conditionally EGs (only 3/84
 184 genes were not absent in the set of genes obtained with bowtie_HMM). Moreover, we
 185 confirmed that the *oprD* gene was considered as EG in PA14 Δ *oprD* but not in PA14 WT. Finally,
 186 we obtained a short but reliable strong set of 30 EGs in LB specific to PA14 Δ *oprD* compared
 187 with PA14WT (Table 3).

188 **Table 3: List of RPKM for the EGs determined to be specific to PA14 Δ *oprD*.**

Locus Tag	Name	RPKM PA14 WT	RPKM PA14 Δ <i>oprD</i>
PA14_RS01270	/	23.666	2.484
PA14_RS04505	/	20.633	0
PA14_RS05905	<i>iscX</i>	35.395	0.6319
PA14_RS09230	<i>cpxR</i>	7.8689	1.2182
PA14_RS11895	<i>tsi2</i>	67.401	0.8142
PA14_RS12140	<i>bqsS</i>	80.294	0.8071
PA14_RS13385	/	198.69	30.934
PA14_RS13560	<i>pvdG</i>	62.052	10.998
PA14_RS13665	/	25.501	6.6364
PA14_RS13690	/	23.72	1.7321
PA14_RS14055	/	3.8567	0
PA14_RS14990	/	26.746	3.0256
PA14_RS15035	/	8.5298	0
PA14_RS15170	<i>opdO</i>	101.93	12.968
PA14_RS15565	/	6.0981	0
PA14_RS15605	<i>mexX</i>	19.539	0.1067

PA14_RS15660	<i>fahA</i>	21.369	3.132
PA14_RS15800	<i>exaE</i>	23.264	3.0936
PA14_RS17305	<i>pscS</i>	27.58	3.5705
PA14_RS18035	<i>ccoO</i>	48.767	13.558
PA14_RS18045	<i>ccoP</i>	30.46	8.4445
PA14_RS19615	/	31.314	1.7252
PA14_RS22095	<i>pdxJ</i>	93.984	6.8983
PA14_RS22870	/	17.336	0
PA14_RS25565	<i>pcnB</i>	33.939	16.314
PA14_RS25580	<i>panC</i>	25.796	4.9059
PA14_RS27060	<i>aceE</i>	63.29	17.359
PA14_RS27920	/	21.391	0.8821
PA14_RS29395	<i>prfH</i>	51.865	0.1033
PA14_RS30300	/	137.36	0

189

190 Most of these genes were not annotated and therefore have as yet unknown functions.
 191 Since OprD is a specific porin that imports small basic amino acids (arginine, lysine, histidine
 192 and ornithine) into PA, we focused on genes related to the metabolism of those basic amino
 193 acids. Two genes leading to precursors of the tricarboxylic acid (TCA) cycle were identified:
 194 *panC* and *fahA*. *panC* encodes a pantoate--beta-alanine ligase (also known as pantothenate
 195 synthetase) that produces (R)-Panthothenate, which plays a role in the production of Coenzyme
 196 A (22). *fahA* encodes a fumarylacetoacetase that produces fumarate, which is one of the key
 197 components of the TCA cycle (23). As the TCA cycle provides precursors of certain amino
 198 acids (24,25), and gluconate is used in the Entner-Doudoroff pathway that produces pyruvate,
 199 needed for TCA cycle (26), we hypothesized that lacking *panC* or *fahA* precludes PA14 from

200 compensating such a nutritive defect, in which the import of arginine, lysine, histidine and
201 ornithine is diminished due to a non-functional OprD porin ($\Delta oprD$).

202

203 Silencing *panC* but not *fahA* affects PA14 $\Delta oprD$ growth

204 We sought to confirming biologically the essentiality of these two genes for PA14 $\Delta oprD$
205 grown in LB. To this end, we first attempted to carry out clean deletions of *panC* and *fahA*. We
206 succeeded in constructing PA14 WT as well as PA14 $\Delta oprD$ mutants lacking *fahA*. Neither of
207 these two FahA-deficient isogenic strains showed any growth defect when grown in LB media.
208 *fahA* was therefore not an essential gene for growth in LB for PA14 (WT and $\Delta oprD$). In
209 contrast to the *fahA* gene, despite numerous attempts, we were unable to cleanly delete *panC*
210 in PA14 WT nor in PA14 $\Delta oprD$. The inability to delete *panC* in PA14 WT and PA14 $\Delta oprD$
211 suggested its essential character for LB growth. However, we could not rule out a bias since we
212 used the same media for deletion and Tn-Seq.

213 Consequently, we aimed at gradually silencing *panC* to determine whether its low or
214 near-zero expression could prevent the growth of PA in LB. To this end, we employed the
215 CRISPR Inhibition method using a Mobile-CRISPRi vector, which embedded a gene-specific
216 sgRNA and a catalytically dead *Cas9* inducible with arabinose (27,28), to control gene
217 expression. CRISPRi isogenic strains were constructed to silence *panC* in PA14 WT and
218 PA14 $\Delta oprD$, but also *fahA*, to confirm our previous results. Both CRISPRi PA14 WT and
219 PA14 $\Delta oprD$ were compared with their isogenic control strains carrying a CRISPRi module
220 with a non-specific sgRNA that did not bind to the PA chromosome.

221 Although the growth curves were quite similar for the isogenic strain grown in LB +/-
222 0.1% arabinose (no and weak *panC* silencing), we observed a growth defect for the OprD-
223 mutant strain when *panC* was deeply silenced at the maximal non-toxic concentration of

224 arabinose (1%) (Fig. 3A) (27). To a lesser extent, such a growth defect was also observed for
 225 PA14 WT. To complete our LB growth analysis when *panC* was silenced, we determined the
 226 Maximum Growth Rate (MGR) of each growth curve. As shown in Figure 3B, at 1% arabinose,
 227 we evidenced a decrease in MGR in *panC*-silenced PA14 WT and PA14 Δ *oprD* ($4.25 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ and
 228 $3.64 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$, respectively) compared to their respective control ($5.10 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ and $5.09 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$,
 229 respectively). Interestingly, silencing *panC* had a more negative impact on bacterial growth of
 230 PA14 Δ *oprD* than PA14 WT in LB.

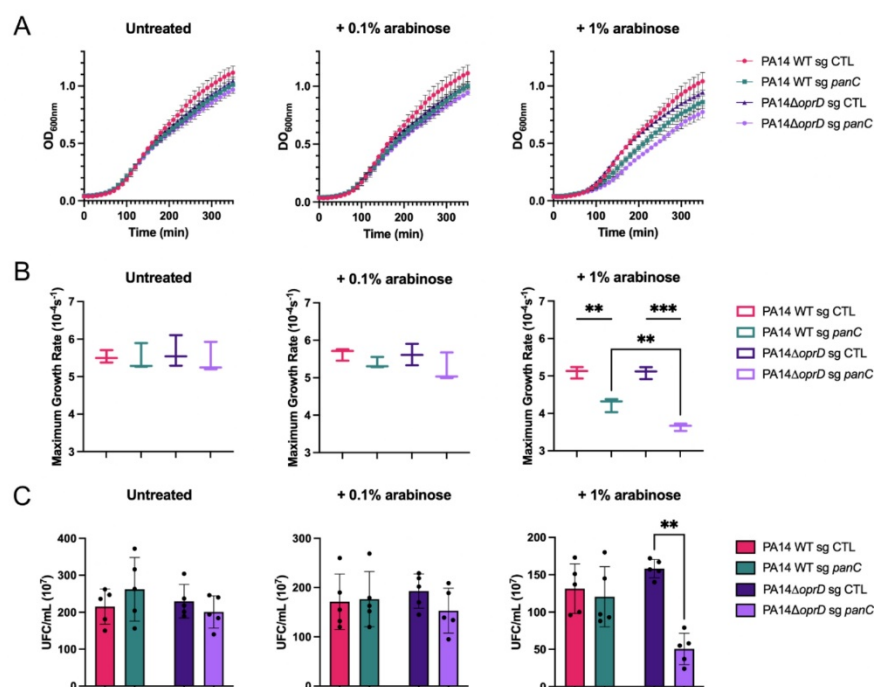


Figure 3: Biological verification of *panC* essentiality in PA14 Δ *oprD* shows reduced growth and biomass. (A) Growth curves of PA14 WT sg CTL, PA14 WT sg *panC*, PA14 Δ *oprD* sg CTL and PA14 Δ *oprD* sg *panC* (pink, green, dark purple and light purple respectively) were realized in Tecan. LB media supplemented with various concentration of arabinose (0.1% or 1%) for 6 hours (n=3). (B) Maximal Growth Rate of the PA14 CRISPRi strains for the Tecan growth curves. Maximum Growth Rate (MGR) was determined as the maximum value of the derivative of the logOD₆₀₀ using R software. Statistics were achieved by unpaired t-test: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$. (C) Colony count of the PA14 CRISPRi stains after culture LB media supplemented with various concentration of arabinose (0.1% or 1%) for 6 hours. All data represent mean values of 5 independent biological replicates, and error bars indicate standard deviation. Statistics were achieved by Mann-Whitney test. Asterisks indicate values that are significantly different as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns (Not significant).

231

232 Next, using colony-forming unit counting, we determined cell viability according to
 233 whether the *panC* gene was silenced or not. On one hand, we found no difference in CFU for
 234 PA14 WT (sg *panC*) compared with its control (sg CTL) at 0, 0.1% and 1% of arabinose (Fig.
 235 3C). On the other hand, we found no difference in CFU for PA14 Δ *oprD* (sg *panC*) compared
 236 with its control (sg CTL) at 0 and 0.1% arabinose, but when *panC* was deeply silenced (1% of
 237 arabinose), we evidenced a decrease of 68% of CFU compared to its control (sg CTL).

238 Using these approaches to assess the growth of *fahA*-silenced PA14 WT and PA14
 239 Δ *oprD*, we confirmed that *fahA* was not essential for growth in LB of the PA14 Δ *oprD* strain.
 240 Indeed, we found no difference in terms of growth curves, MGR and CFU counting between
 241 the sg *fahA* strains and their sg CTL isogenic control strains (Fig. S2).

242 Overall, these results showed that silencing *panC* had a negative impact on the growth
 243 of the OprD-mutant PA14 strain in LB. This allowed us to define *panC* as a “growth defect”
 244 gene. However, given that the CRISPRi method is not equivalent to a clean deletion, it is likely
 245 that the persistence of a very slight expression of *panC* explained why we still harvested CFUs
 246 and therefore were unable to classify unambiguously this gene as an EG for PA14 Δ *oprD* *in*
 247 *vitro* (LB).

249 **Lack of uptake by OprD does not explain the need of *panC* for *in vitro* growth**

250 We assessed whether compensating the decrease of basic amino acids produced by the
 251 TCA could overcome the growth defect in PA14 WT but not in PA14 Δ *oprD* when *panC* was
 252 silenced. Using minimal media (M9 minimal salt) supplemented with arginine, lysine, histidine
 253 and ornithine but also with gluconate (also imported by the OprD porin), we counted CFUs on
 254 agar plates after CRISPRi silencing of *panC* (1% arabinose, for 6h). Although we observed less
 255 viable PA14 cells for both *panC*-silenced PA14WT and PA14 Δ *oprD* (Sg *panC*) than for their

256 respective controls (Sg CTL) when supplemented with amino acids (Fig. 4), no statistical
 257 difference was found between PA14 WT (green bar) and PA14 Δ *oprD* (purple bar). Such a
 258 supplementation was not sufficient for PA14 WT to cope with the lack of *panC* and provide
 259 better growth than the *oprD* mutant PA14, which cannot benefit from such supplementation.
 260 These results showed that lack of import by the *oprD* porin did not explain why silencing *panC*
 261 led to an *in vitro* growth defect of PA14 Δ *oprD*.

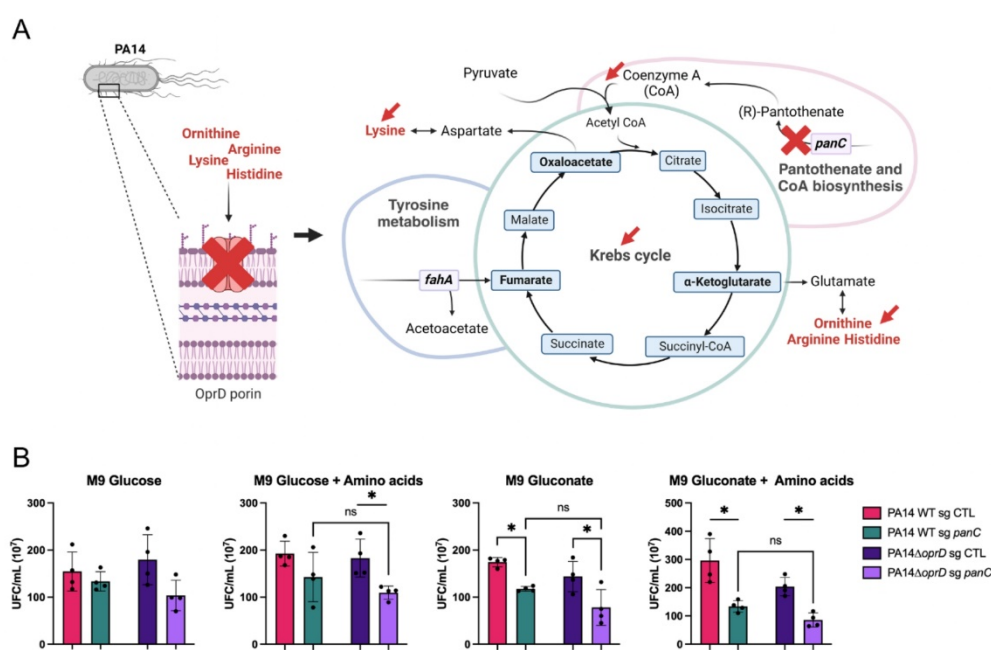


Figure 4: Lack of import linked to *OprD* porin loss did not cause *panC* essentiality for the PA14 Δ *oprD* strain. (A) Hypothesis of the consequences for PA14 Δ *oprD* of the inhibition of *panC*. Red arrows indicate the supposed diminutions observed when *panC* is not functional. Created with BioRender.com. (B) Colony count of the PA14 CRISPRi strains after culture with 1% arabinose in Minimal Media M9 supplemented with glucose or gluconate, with or without the 4 amino acids using the *OprD* porin (Arginine, Lysine, Histidine and Ornithine) for 6 hours. All data represent mean values of 4 independent biological replicates, and error bars indicate standard deviation. Statistics were achieved by Mann-Whitney test. Asterisks indicate values that are significantly different as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns (Not significant).

262

263 Silencing *panC* impacts the FAS pathway in OprD-deficient PA.

264 Given that lacking the *panC*-encoded pantothenate synthetase could preclude CoA
265 production, which is needed for fatty acids (FA) production (29), we hypothesized that silencing
266 *panC*, could lead to deregulate FA synthesis (FAS) and affect the membrane structure.

267 FA play an important role in membrane structure, modulating membrane fluidity. The
268 more unsaturated FA present, the greater the membrane fluidity. It has been reported that *sigX*
269 regulates the expression of *cmpX* and various enzymes involved in FAS by balancing the ratio
270 of saturated and unsaturated FA. Overexpression of *sigX* increased short FA, the *fabD*, *fabG*,
271 *fabY* and *fabZ* genes are each involved in different stages of the FAS pathway, and then
272 membrane fluidity (30–33) (Fig. 5A). Accordingly, we assessed the expression of these genes
273 in the context of silencing *panC* in the isogenic PA14Δ*oprD* and PA14 WT strains. As shown
274 in Figure 5B, we found no difference in *sigX* and *cmpX* expression between the two CRISPRi
275 control strains (1.03 and 1.03-fold change respectively for PA14Δ*oprD* sg CTL compared to
276 PA14 WT sg CTL). Therefore, loss of the OprD porin did not appear to impact *sigX* and *cmpX*
277 expression. However, we highlighted that *sigX* expression was drastically decreased upon *panC*
278 silencing in PA14 WT sg *panC* and PA14Δ*oprD* sg *panC* compared to PA14 WT sg CTL (0.47
279 and 0.26-fold change respectively), with slightly lower expression in the OprD mutant strain
280 (Fig. 5A). We noted a trend towards the decreased expression of *cmpX* in PA14Δ*oprD* sg *panC*
281 with a non-significative 0.54-fold-change. Our results were found to be agreement with a less
282 fluid membrane.

283 We did not find any significant change in *fabD*, *fabG*, *fabY* and *fabZ* expression in
284 PA14Δ*oprD* sg CTL compared with PA14 WT sg CTL (0.87, 0.98, 1.02 and 1.10-fold change,
285 respectively) (Fig. 5C). Although we showed a non-significant 0.58-fold change expression of
286 *fabY* for PA14Δ*oprD* sg *panC* compared PA14 WT sg CTL, we found decreased expressions of
287 *fabD*, *fabG* and *fabZ* (0.46, 0.52 and 0.62-fold change, respectively). For *fabD*, we also

observed a decreased expression for PA14 WT sg *panC* versus its control (Fig. 5C). Overall, these results indicated a decrease in unsaturated FA synthesis when *panC* was silenced, which and could therefore affect the membrane homeostasis. This could explain the essential nature of the *panC* gene in the OprD-defective PA14 strain.

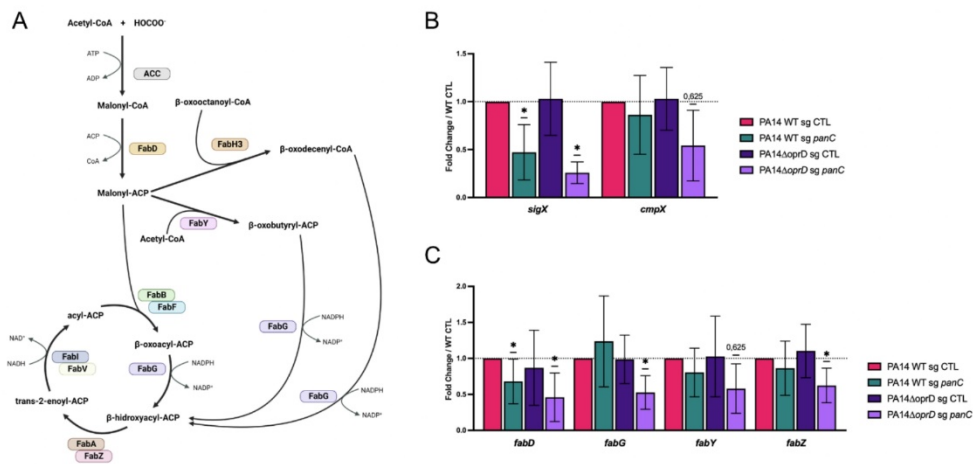


Figure 5: Silencing *panC* deregulates the expression of FAS genes. (A) FA biosynthesis pathway. (B) Relative expression of *sigX* and *cmpX* in PA14 WT sg *panC* (dark green) and PA14Δ*oprD* sg *panC* (light purple) in comparison to their isogenic PA14WT and PA14Δ*oprD* strain carrying sg CTL (pink and dark purple respectively), exposed to 1% arabinose for 6 hours, normalized with *gyrB*. (C) Relative expression of *fabD*, *fabG*, *fabY* and *fabZ* in PA14 WT sg *panC* (dark green) and PA14Δ*oprD* sg *panC* (light purple) in comparison to their isogenic PA14WT and PA14Δ*oprD* strain carrying sg CTL (pink and dark purple respectively), exposed to 1% arabinose for 6 hours, normalized with *gyrB*. All data represent mean values of 6 independent biological replicates, and error bars indicate standard deviation. Statistics were achieved by Wilcoxon test. Asterisks indicate values that are significantly different as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; ns (Not significant).

Silencing *panC* reduces virulence of OprD-deficient PA against 16HBE human bronchial epithelial cells

Carbapenem-resistant OprD-deficient PA strains are a global threat as physicians may face therapeutical impasses. In light of our findings concerning the functional and metabolic alterations of PA14 Δ*oprD* upon silencing *panC*, we investigated whether a therapeutical strategy aiming at inhibiting *panC* could be an anti-virulence strategy for treating PA infections. We infected 16HBE cells with PA14 WT sg *panC* and PA14Δ*oprD* sg *panC*, as well as their

isogenic CRISPRi control strains (PA14 WT sg CTL and PA14 Δ *oprD* sg CTL) and monitored the 16HBE cell death for 48 hours by time-lapse microscopy. When setting up our 16HBE infection model, we found that 1% arabinose, for CRISPRi induction, precluded propidium iodide-based fluorescence monitoring as well as image analyses (Fig. S3). We assumed that 1% arabinose may reach a toxic concentration for bacteria delaying the time of cell death of 16HBE by all CRISPRi strains. Then, we induced CRISPRi upon exposure to 0.5% arabinose during 16HBE infection. To rigorously analyze the images obtained from time-lapse microscopy, we used 3 different techniques to compare three readouts for assessing 16HBE cell death by PA: (i) the 50% intensity time (IT50), (ii) the threshold time according to intensity (TTI) and (iii) the 50% of dead cells time (DCT50) (Fig. 6). We evidenced increased virulence for PA14 Δ *oprD* sg CTL against 16HBE cells compared to PA14 WT sg CTL with lower TTI (11.74 vs 14.94h, respectively) and DCT50 (11.44 vs 17.94h, respectively) (Fig. 6C). These results were in agreement with previous studies (11–13). We found an increased IT50 when inhibiting *panC* in PA14 WT (27.4h for sg *panC* vs 21.9h for sg CTL) while TTI and DCT50 readouts were not statistically increased. This could be explained by the late fluorescence intensity associated with bacterial death that created a haze interfering with the intensity measurements, which was therefore erroneously considered as delayed. IT50 turned out to be the least reliable readout, which reinforced our strategy of analyzing cell death in terms of IT50, TTI and DCT50. Such a discrepancy led us to draw no conclusion on the effect of *panC* inhibition in PA14 WT. In the case of PA14 Δ *oprD*, based on the three readouts, we found that the time of 16HBE cell death following infection was greatly extended when *panC* (PA14 Δ *oprD* sg *panC*) was silenced compared with its isogenic control (PA14 Δ *oprD* sg CTL) (26.5h vs 11.4h for DCT50; 16.9h vs 11.7h for TTI; and 26.8h vs 19.7h for IT50). Moreover, silencing *panC* in PA14 Δ *oprD* also showed extended cell death time compared to PA14 WT sg CTL (respectively 16.9h vs 14.9h

with TTI and 26.5h vs 17.9h with DCT50). Overall, we showed that *panC* inhibition reduced the virulence of the carbapenem-resistant OprD mutant PA14 Δ *oprD*.

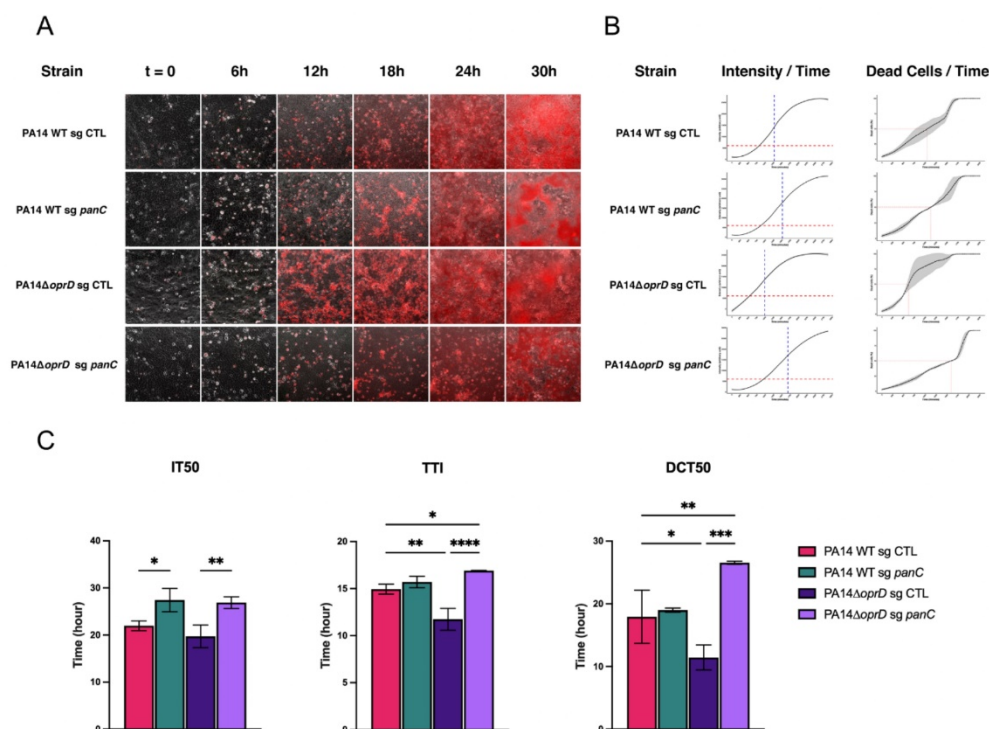


Figure 6: Silencing *panC* reduced virulence of OprD-deficient PA against 16HBE cells. (A) Kinetics of 16HBE cell death following infection with CRISPRi isogenic OprD-producing (WT sg CTL and sg *panC*) and its OprD-defective derivative PA14 strains (Δ *oprD* sg CTL and sg *panC*) for *panC* inhibition. Dead cells are marked with propidium iodide and appear red. (B) Curve of intensity over time corresponding to the well shown in (A). The red dotted line corresponds to the threshold time according to intensity (TTI) that is the time at which the intensity measured crosses the arbitrary threshold set at 6000 (arbitrary units). The blue dotted line corresponds to the 50% intensity time (IT50). Percentage of dead cells over time is represented on the right. Red lines indicate the time corresponding to 50% dead cells time (DCT50) for each strain. Standard deviations are displayed in grey. (C) Average time for cell death for PA14 WT sg CTL, PA14 WT sg *panC*, PA14 Δ *oprD* sg CTL and PA14 Δ *oprD* sg *panC* depending of the used readout (IT50 on the left, TTI in the middle and DCT50 on the right). All data represent mean values of 3 independent biological replicates and error bars indicate standard deviation. Statistics were achieved by ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test. Asterisks indicate values that are significantly different as follows: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns (Not significant).

326

Discussion

The loss of the OprD porin is the major determinant of resistance against the last resort carbapenem antibiotics (34). OprD loss has been described as a basis for enhanced fitness and virulence *in vivo* (11–13). Therefore, tackling carbapenem-resistant OprD-deficient PA is in line with the World Health Organization (5,35), which considers carbapenem-resistant PA as a critical priority for which new antimicrobial drugs or alternate therapies are needed. Following the example of many studies that have determined EGs PA14 WT in various condition (11,15,19,20), we used Tn-Seq to determine, for the first time, the specific EGs of PA14 Δ oprD in LB. After evaluating the best bioinformatic method to analyze our Tn-Seq data, we found an EG for *in vitro* growth of PA14 Δ oprD that was likely to be a potential target for alternate therapies.

A large number of algorithms have been developed to analyze Tn-Seq data, including HMM-based methods for identifying essential sites and regression analyses using gene saturation or series of consecutive empty sites. These approaches were implemented in tools such as TnseqDiff (36) ESSENTIAL (37), Magenta (38), Tn-seq Explorer (39), ARTIST (40), TRANSIT (18), TSAS (41). FiTnEss, was introduced to define the core essential genome of PA, as another statistical method developed to identify EGs (15). TRANSIT is the most popular tool and includes a high number of tools for analyzing Tn-Seq data, from pre-processing to gene enrichment. One of the main limitations of available studies is the absence of a gold standard set of EGs to evaluate the analysis process. Indeed, many studies determined EGs for PA based on their own reference and not on a set of reference genes that could be used to initially validate any method to be considered. Thus, (i) by establishing two sets of gold standard EGs (GOLD_115 and GOLD_84), we concluded that Bowtie_HMM and FiTnEss enabled us to identify reliable EGs of each PA14 WT and PA14 Δ oprD, and (ii) by intersecting the EGs (FiTnEss FILTER and Bowtie_HMM_intersection), we identified a strong, short but

352 reliable set of 30 EGs in LB specific to PA14 Δ *oprD* versus PA14WT. We anticipate that
353 making our GOLD_115 and GOLD_84 publicly available will help the scientific community
354 for future Tn-Seq analyses.

355 Among the EGs for *in vitro* growth in LB of PA14 Δ *oprD*, we focused on two genes,
356 *fahA* and *panC*, linked to the TCA pathway. It is worth noting that despite all the bioinformatics
357 precautions described above, the biological validation of an EG remains an imperative. We
358 invalidated *fahA* since its PA14 Δ *oprD* clean deleted mutant, among other things (see results)
359 was viable *in vitro*. For *panC*, we failed to delete it in PA14 Δ *oprD* but we showed, using a
360 CRISPRi approach, that when silenced, it impacted PA14 Δ *oprD* with reduced growth in LB.
361 Such a strategy did not fully inhibit gene expression, unlike clean deletion. Thus, although we
362 could not affirm that *panC* is a *stricto sensu* EG, it could at least be considered a growth defect
363 gene for PA14 Δ *oprD* in LB.

364 *panC* codes for pantothenate synthetase that produces pantothenate, which is required
365 for CoA production. Moreover, within cultures of *Escherichia coli* or *Salmonella*
366 Typhimurium, it has been reported that pantothenate supplementation increased the synthesis
367 of molecules requiring CoA intermediates (42–44). Hence, as CoA is needed in the TCA cycle,
368 deregulation of CoA production by *panC*, in the pantothenate pathway, could impact the
369 downstream effects of the TCA cycle (45,46). Our first hypothesis to link the EG *panC* to OprD
370 was that the deregulation of the TCA could decrease arginine, lysine, histidine and ornithine
371 synthesis, and thus could not compensate for the lack of import of these basic amino acids due
372 to the loss of OprD. Using culture supplemented with these basic amino acids, we showed that
373 the lack of uptake by OprD did not explain the essentiality of *panC* for *in vitro* growth. Given
374 that, OprD is the second major porin present within the membrane of PA, OprF being the first
375 one (10), and OprF has been previously described as playing a key role in maintaining PA
376 membrane integrity (10), we questioned whether FAS impairment following TCA deregulation

could have a highly deleterious impact on the membrane of the OprD-deficient PA14 strain. We found a decreased expression of the mechanosensitive ion channel-encoding *cmpX* gene and its regulator, the extracytoplasmic sigma factor *sigX* (47) in PA14 Δ *oprD* when *panC* was silenced, which pointed to altered membrane structure. In line with these results, we showed a decrease in the expression of genes involved in FAS, particularly *fabD*, which is involved in an early stage of the FAS (32), and *fabG*, *fabY* and *fabZ*, which participate in FA elongation leading to unsaturated FAs (48). Taken together, these results indicated that the essentiality of *panC* in the OprD-defective PA14 strain was likely due to an alteration in membrane homeostasis consecutive to a decrease in unsaturated FA synthesis in the absence of *panC*.

While all organisms synthesize CoA, humans cannot synthesize pantothenate *de novo*, offering therefore a bacteria-specific target. Such a strategy was previously considered (49,50), but sidelined because antimicrobial susceptibility testing failed to show *in vitro* growth inhibition of bacteria treated with competitive inhibitors of pantothenate synthetase (51,52). It was suggested that either pantothenate synthetase was not susceptible to inhibition or its inhibition was irrelevant to bacterial survival and growth. However, it has been recently described that CoA synthesis was essential in *Toxoplasma gondii* tachyzoites because they were unable to salvage CoA or intermediates from the pathway (53). Thus, pantothenate synthesis has been proposed as a promising target for *T. gondii* persistence. On one hand, based on the essentiality of *panC* *in vitro* for PA14 Δ *oprD*, we took into question the irrelevance of inhibiting the pantothenate synthetase. On the other hand, taking our results into account, these recent findings boosted our interest in targeting *panC* during PA infections as an alternate therapeutic strategy in the context of antimicrobial resistance. PA is a major pathogenic bacterium involved in often fatal respiratory tract infections in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease patients but also critically ill patients hospitalized in intensive care unit. PA penetrates through the airway tract, and the human airway epithelium is the

402 physical and functional barrier that prevents infection from inhaled pathogens (54). For this
403 reason, we assessed the anti-virulence potential of *panC* inhibition in a 16BHE model of PA
404 infection. We showed that silencing *panC* by CRISPRi extended the time of cell death by the
405 carbapenem-resistant OprD-defective PA14 strain compared to that of the non-silenced strain.

406 To conclude, we introduced a gold standard dataset of EGs available to compare the
407 metrics of different methods for Tn-Seq analysis. It allowed us to provide, for the first time, the
408 EGs *in vitro* of PA14 Δ *oprD*. The reason of essentiality of one of them, *panC*, was deciphered
409 and we shed a new light on its inhibition as a target for treating carbapenem-resistant OprD-
410 defective PA pulmonary infections. We are aware that our results represent only a first step, but
411 we anticipate to further complete our findings by identifying the EGs of PA14 Δ *oprD* during
412 infection *in vivo* and searching for potential *panC* inhibitors.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

The laboratory strain *P. aeruginosa* PA14 UCBPP (55) (and its derivatives) were used in this study. The PA14 parent wild-type (WT), mutant lacking OprD ($\Delta oprD$ by clean deletion) and the OprD mutant complemented with *oprD* under the control of its native promoter strains were gifts from D. Skurnik (11,12). CRISPRi strains were made using two plasmids pJMP1039 and pJMP1237, that were a gift from Carol Gross & Jason Peters & Oren Rosenberg (Addgene plasmid # 119239; <http://n2t.net/addgene:119239>; RRID:Addgene_119239 - Addgene plasmid # 119262; <http://n2t.net/addgene:119262>; RRID:Addgene_119262) with *E. coli* MFD strain as donor. CRISPRi strains were made for silencing two genes, *panC* and *fahA* in PA14 WT and PA14 $\Delta oprD$, and a control strain was made using a non-targeting spacer against PA14 DNA. List of the strains used for this work are referenced in table S1 and plasmids in table S5. Bacterial cultures were incubated at 37 °C on Lysogeny Broth (LB) (BD Difco™) or M9 Minimal Salts, 5x (BD Difco™) when needed under agitation at 250 rpm.

PA14 $\Delta oprD$ TnBank preparation

To construct the TnBank, PA14 $\Delta oprD$ was grown overnight in lysogeny broth (LB) and *E. coli* SM10 λ pir/pSAM_DGH was grown overnight in LB + gentamicin 15 μ g/mL at 37°C at 250 rpm. Equal volumes of both cultures were mixed and centrifuged for 5 min at 3000 rpm. Pellets were resuspended with 200 μ L of water for two washes, and finally resuspended in 200 μ L of LB. Matings for conjugation were performed by plating mixed bacteria in spots onto LB agar for 3 hours at 37°C to transfer pSAM_DGH into PA14 $\Delta oprD$. The transposon embedded in the plasmid was randomly inserted into a single TA site per PA14 $\Delta oprD$ bacterium, inactivating the gene wherever it was found. The spots were then resuspended in LB and

438 mutants selected on LB + gentamicin 30 µg/mL + irgasan 25 µg/mL at 37°C for 24 to 48 hours.
439 All colonies (around 300,000 mutants) were scrapped and conserved in cryotubes, which were
440 finally pooled in 60 mL of LB with gentamicin 20 µg/mL and cultured for 2 hours at 37°C at
441 250rpm. The resulting PA14 $\Delta oprD$ Tn Bank was dispensed into 1mL cryotubes containing
442 glycerol for storage at -80°C.

443

444 Tn-Seq samples preparation

445 TnBanks samples were prepared as described previously (11–13). Briefly, TnBanks were grown
446 overnight in 5mL of LB at 37°C at 250 rpm. Cultures were diluted to OD₆₀₀=1 and centrifuged
447 15 min at 3000 rpm. Bacterial DNA was extracted with QIAamp® minikit (Qiagen) and digested
448 with MmeI enzyme for 4 hours at 37°C. Samples were then purified with QIAquick® PCR
449 Purification kit (Qiagen) and run on 2% agarose gel to only retrieve fragments between 1500
450 and 2000 bp, which were then purified with QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen). DNA was
451 next ligated to Illumina adapters and amplified by PCR to obtain libraries, which were then
452 sequenced using a NextSeq500.

453

454 Pre-processing steps

455 Reads were collected in a single file per sequencing run. To filter out PhiX reads, the reads of
456 an Illumina technology control were mapped against the PhiX sequence with bowtie2 (56) and
457 the resulting unmapped reads were retained. PhiX reads accounted for 24% and 23%
458 respectively in each run. The reads contained the P2 adapter, then the sample-specific barcode
459 (6 bp), 16-18 bp of the PA genome followed by the reverse complement of the 30-nucleotide
460 P1M6GAMmeI sequence.

461 (ACAGGTTGGATGATAAGTCCCCGGTCTATC). To identify the reads from each sample
 462 and extract the 16-18 bp of PA for downstream analysis, cutadapt (57) was used with this
 463 command line: cutadapt -g
 464 "sample_BARCODE(6nt);min_overlap=6;e=0...ACAGGTTGGATGATAAGTCCCCGGTC
 465 TATC;min_overlap=30;e=0" --discard-untrimmed -m 16 -M 18 -j 0 -o output.fastq
 466 noPhiX.fastq.

467 This command line extracted the subsequence with a size between 16 (-m 16) and 18
 468 nucleotides (-M 18) that lay exactly between the sample barcode and the P1M6GAMmeI
 469 sequences in error-free reverse complement (e=0). At the end of this step, a Fastq file was
 470 obtained for each sample containing only the 16-18 bp sequences from PA genome.

471

472 **Read mapping and reads-counts file**

473 Two mappers were used in this study using the trimmed fastq files: BWA (16) and bowtie (17).
 474 BWA version 0.7.12 was directly used with the TRANSIT v3.2.3 tpp command on the PA
 475 UCBPP-PA14 genome sequence (NC_008463.1), producing a .wig file. Bowtie 1.1.2 was used
 476 with the option -v 0 (no mismatches) -m 1 (report only unique mapping) producing a sam file.
 477 Scripts from <https://github.com/SuzanneWalkerLab/5SATnSeq> (sam_to_tabular.py and
 478 make_wig.py) were used to obtain a .wig file from the alignment file. FiTnEss took a sam file
 479 as input and returned a tally file with the script "tally.py". Then the tally file is used with FitNess
 480 function in R with defaults parameters but manually updating the reference genome to
 481 NC_008463.1.

482

483 **Statistical methods to detect essential genes**

484 The TRANSIT suite offers several statistical methods to detect essential genes. HMM proposes
485 a 4-state model allowing for detecting regions as essential (E), non-essential (NE), growth-
486 defect (GD) and growth-advantage (GA). The Gumbel method makes a call based on the
487 longest consecutive sequence of TA sites without insertion into genes and calculates the
488 probability of this using a Bayesian model. The important features of FiTnEss are that (i) it
489 evaluates genes (rather than individual TA sites or stretches of TA sites) and (ii) it uses a simple
490 two-parameter model to capture all the salient features of the data (the simple model having
491 greater statistical power). To vary the stringency, two different levels of multiple testing
492 adjustment can be applied: one with maximal stringency, which provides the most reliable set
493 of essential genes [family-wise error rate (FWER)], to identify genes with few or no sequencing
494 reads, and the other with high stringency but slightly relaxed [false discovery rate (FDR)] to
495 identify genes that are statistically significant but contain a low number of reads. Genes with
496 an adjusted P -value < 0.05 in the replicates were predicted to be essential.

497

498 **Methods for EGs determination (software and normalization)**

499 Firstly, the impact of software parameters was studied for all the methods. The $-r$ parameter is
500 available in the TRANSIT suite and allows replicates to be processed by averaging or summing
501 the reads counts in the datasets. By default, read counts are summed for Gumbel and averaged
502 for HMM. This should not have effect on Gumbel, apart from potentially affecting spurious
503 reads. For HMM with regular datasets (i.e. mean-read count > 100) it is recommended to
504 average the read counts. For sparse datasets, it is recommended to sum the read counts, which
505 can produce more accurate results. The HMM implementation suggested to use the loess option,
506 which eliminates any bias linked to genomic position. Next, we investigated the impact of
507 normalization. Totreads normalizes datasets over the total read counts and scales them to have

the same mean over all counts; TTR (Trimmed Total Reads), normalizes over the total read counts (like Totreads), but trims top and bottom 5% of read counts. This is the recommended normalization method for most cases as it has the benefit of normalizing for difference in saturation in the context of resampling. Nzmean normalizes datasets to have the same mean over the non-zero sites. Quantile normalizes datasets using the quantile normalization method described by Bolstad et al. (58). Betageom normalizes the datasets to fit an “ideal” Geometric distribution with a variable probability parameter p . Especially useful for datasets that contain a large skew. Zinfbn fits a zero-inflated negative binomial model, and then divides read-counts by the mean. Finally, with nonorm parameter no normalization is performed.

517

518 **Methods for conditional essentiality identification**

Resampling, proposed in TRANSIT, is based on a permutation test, and determines the read-counts that are significantly different from one condition to another. The ANOVA method, also available in TRANSIT, performs a one-way ANOVA test for each gene under all conditions. It takes into account the variability of normalized counts between TA sites and between replicates, to determine whether differences between mean counts for each condition are significant. Finally, the TRANSIT suite includes the Zero-Inflated Negative Binomial (ZINB) method, which can be applied to two or more conditions at once. The TRANSIT authors showed that the ZINB method typically identifies 10-20% more varying genes than resampling (and significantly outperforms ANOVA in detecting significant variability between conditions).

From results obtained from EGs identification methods, e.g. FiTnEss FDR or HMM_Es+GD, it was possible to intersect the lists of two conditions to obtain the EGs specific to each condition. Inspecting the results, we decided to add a filter to these sets of genes filtering out the essential genes in one condition which are not classified as non-essential for all samples of

the other condition. Indeed, this case can potentially represent false positives, as the gene can be discarded from the list of essential genes simply because it is missing in one sample.

534

535 EGs annotation

All the genes were annotated and clustered in function class using available resources from different databases like BioCyc Genome Database Collection (<https://biocyc.org/PAER208963/organism-summary>), The *Pseudomonas* Genome Database (<https://pseudomonas.com/>) (59) or GenomeNet (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:pau).

541

542 Deletion mutant construction

Deletions of genes in PA14 $\Delta oprD$ strain were performed using the replacement vector pEXG2 (60). Upstream and downstream fragments of ~ 500pb flanking genes were amplified by PCR from PA14 genomic DNA using overlapping primers. Linearized fragment of pEXG2 was also obtained by PCR. The 3 fragments were ligated using the Gibson Assembly® Cloning Kit (New England Biolabs). The created pEXG2:: $\Delta fahA$ and pEXG2:: $\Delta panC$ were transformed into *E. coli* DH5 α and positive clones selected on LB agar plates containing 15 mg/L of gentamicin. To transfer the plasmid in PA14 strain, triparental conjugation were performed between donor strain *E. coli*/ pEXG2:: $\Delta fahA$ or pEXG2:: $\Delta panC$, recipient strain PA14 WT and PA14 $\Delta oprD$ and helper strain *E. coli* HB101/pRK2013. The PA14 mutants were selected using LB agar mediums supplemented with irgason 25mg/L and gentamicin 75mg/L. The merodiploid gentamicin-resistant PA14 strain was then cultured in LB broth containing 75 mg/L of gentamicin to exponential growth and streaked onto LB agar plates containing 12% sucrose for the allelic exchange. Sucrose-resistant colonies were tested to confirm gentamicin

susceptibility, indicating excision from the genome of the pEXG2 backbone by double-cross-over event and thus gene replacement. Gene deletions were verified by PCR and sequencing.

558

559 Construction of Mobile-CRISPRi vector and strains

560 The oligonucleotides used to create the sgRNA were designed as described by R.W. Ward
561 (https://github.com/ryandward/Pseudomonas_sgRNA). Construction of vectors and strains was
562 performed following published protocols (28) with slight adjustments. Briefly, annealed
563 oligonucleotides were ligated to the BsaI-digested pJMP1237 plasmid. Such vectors and
564 pJMP1039 were transferred in *E.coli* MFD DAP- strains by electroporation. Mobile-CRISPRi
565 strains were constructed by tri-parental mating with PA14 WT or PA14 Δ oprD. *E. coli* donor
566 strains for the plasmids (*E.coli* MFD DAP-::pJMP1039 and *E.coli* MFD DAP-::pJMP1237 with
567 chosen spacer) were grown overnight in LB + 300 μ M DAP + 100 μ g/mL ampicillin. The PA14
568 recipient strain were grown overnight in LB. Two milliliters of each culture were centrifuged
569 at 7000 $\times$ g for 2min. Pellets were resuspended together in 1mL of LB and centrifuged and
570 washed in LB two more times. Final pellets were resuspended in 200 μ L of LB and streaked on
571 a cellulose filter and incubated overnight at 37°C. Filters were resuspended in 5mL of LB and
572 vortexed. Pellets were resuspended in 200 μ L of LB and plated for selection on LB + gentamicin
573 75 μ g/mL. Vector integration were then verified by PCR and sequencing.

574

575 Gene silencing with CRISPRi

576 Strains transfected with the constructed vectors were cultured overnight at 37°C in LB at 250
577 rpm. Cultures were adjusted to OD₆₀₀=0.05 and cultured if needed with 0.1% or 1% arabinose
578 either in 96 transparent flat bottom well plate using a SPARK® multi-mode microplate reader
579 (Tecan®) with 200 μ L per well for 24 hours at 37°C and 250 rpm and DO₆₀₀ lecture every 10
580 minutes, or in a classic culture tube for 6 hours at 37°C and 250 rpm that afterward were diluted

581 at 10^{-6} and spread on LB agar to determine survival by colony count after 24h at 37°C. For
582 growth curves realized in SPARK® multi-mode microplate reader, Maximum Growth Rate were
583 determined following R script published in G. Royer paper (61). Results were analyzed by
584 unpaired t-test.

585

586 **RT-qPCR**

587 First-strand cDNA synthesis and quantitative real-time PCR was performed using the KAPA
588 SYBR® FAST kit (CliniSciences) on the LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) using the
589 primers indicated in Supplementary Table S6. Gene transcript levels were normalized to *gyrB*
590 as a housekeeping control gene. Gene expression levels were assessed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method
591 (62,63) in respect to the MIQE guidelines (63). The relative fold-difference was expressed
592 against the appropriate reference strains (PA14 WT CTL or PA14 Δ *oprD*g CTL). All
593 experiments were performed as six independent replicates with all samples tested in triplicate.

594

595 **16HBE cells infection**

596 16HBE cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD,
597 USA). Cells were grown in a fully humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. 16HBE cells
598 were seeded on a Falcon 24-well plate (Corning, New York, United States), coated with type I
599 collagen at 18.6 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint - Louis, United States), in Dulbecco's Modified
600 Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™ (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United
601 States) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin (100
602 U/ml)/streptomycin (100 g/L). In each well, 350,000 cells were seeded on day 1 (D1), in
603 DMEM GlutaMAX™ medium with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. At D3, when
604 the cells were confluent, they were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) to remove

antibiotics prior to infection with PA14 strains. For infection, 900 μ L of FBS-free, antibiotic-free DMEM GlutaMAXTM medium was added to 16HBE cells with propidium iodide and arabinose if required. Cells were infected with 100 μ L of PA14 culture adjusted to 10⁶ CFU/mL.

608

609 Time-lapse microscopy

Infected 16HBE culture were placed in the incubation chamber of an inverted microscope (Axio Observer Z1, Zeiss[®]), at 37°C under 5% CO₂. Using MetaMorph[®] software (Molecular Devices), time-lapse microscopy was performed with a CMOS ORCA Flash 4.0 V2 camera (Hamamatsu, Japan), to record infection evolution by image acquisitions of the infected cells every 30 min for 72h (3 images/transwell). For cell death visualization, at each time point, a phase-contrast image and a red fluorescent image were recorded in parallel. Red fluorescence signal corresponding to propidium iodide necrotic dye was captured with a 545/25-nm excitation filter, a 570-nm beamsplitter, and a 607/70 bandpass emission filter. Composites images were processed using Image J software (National Institutes of Health, USA) and were then analyzed using three methods: 50% intensity time (IT50), time threshold according to intensity (TTI) and 50% dead cells time (DCT50).

621

622 Fluorescence intensity analysis

IT50 is defined as the time required for the fluorescent signal to reach 50% of the maximal intensity, which correspond to the maximum intensity plateau obtained during infection. It was determined with log-logistics models by using “drc” package (<https://CRAN.R-project.org/package=drc>) on R Software (R 4.2.1 GUI 1.79, R Foundation for Statistical Computing, 2021). TTI is defined as the time required for the fluorescent signal to cross the threshold (ie exceeds background level). It was determined based on an intensity threshold calculated according to the spontaneous intensity of 16HBE cells over time, without bacteria,

630 with and without the presence of 0.5% arabinose. Based on preliminary data, a threshold of
631 6000 (arbitrary units) was determined which correspond to an intensity point that cells without
632 PA14 infection did not reach. Time corresponding to the threshold value was calculated using
633 R Software.

634

635 **Cell Death Analysis**

636 The Trainable Weka Segmentation (TWS) plugin, a machine-learning tool, was utilized for
637 pixel-based classification (64). This plugin combines various image features with a wide array
638 of machine learning algorithms from the Waikato Environment for Knowledge Analysis
639 (WEKA) to categorize pixels into different class memberships. The procedural approach was
640 as follows. No pre-processing was necessary. The TWS classifier was created using a dataset
641 of 14 randomly selected images as the training data from a larger set of images. Region of
642 Interest (ROI) selections were performed to classify IP positive cells as class 1 and background
643 as class 2. Classifier was then trained and assessed for misclassified area. This training process
644 was repeated multiple times to fine-tune the classifier. The training features used included
645 Gaussian blur, the Hessian, the difference of Gaussian, and the Sobel filters. The classifier was
646 subsequently validated using a dataset of 24 representative image sequences. For each of the
647 three different experiments, stacks of 97 images were segmented by applying the classifier. A
648 FIJI macro was generated to count IP-positive cells, involving successive steps of processing,
649 including conversion to a mask, watershed segmentation, and analysis of particles. The number
650 of IP-positive cells for each image was then determined and associated with specific time points
651 to analyze cell death over time. From these data, we determined DCT50 by obtaining a
652 percentage from the number of dead cells, then the time corresponding to 50% dead cells was
653 calculated using R Software.

654 **Acknowledgement:** The authors thank the Platform of Cell and Tissue Imaging (PICT) for
655 imaging core facilities. We would like to deeply thank Dr Christophe Audebert and Dr Delphine
656 Beury for their advice and technical assistance.

657 **Funding:** This research was funded by the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA)
658 and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

659 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

660

References

1. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 2013;67(3):159–73.
2. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):29–70.
3. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010;15(7):1037–56.
4. Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, et al. Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol*. 2008;105(5):1491–501.
5. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):1–12.
6. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582–610.
7. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1772–80.
8. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):427–36.
9. Trias J, Nikaïdo H. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem*. 1990;265(26):15680–4.
10. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(5):698–722.
11. Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, Lory S, et al. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):e1003582.
12. Skurnik D, Roux D, Cattoir V, Danilchanka O, Lu X, Yoder-Himes DR, et al. Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(51):20747–52.

- 696 13. Roux D, Danilchanka O, Guillard T, Cattoir V, Aschard H, Fu Y, et al. Fitness cost of
697 antibiotic susceptibility during bacterial infection. *Sci Transl Med*. 2015;7(297):297ra114-
698 297ra114.
- 699 14. Cain AK, Barquist L, Goodman AL, Paulsen IT, Parkhill J, Opijnen T van. A decade of
700 advances in transposon-insertion sequencing. *Nat Rev Genet*. 2020;21(9):526–40.
- 701 15. Poulsen BE, Yang R, Clatworthy AE, White T, Osmulski SJ, Li L, et al. Defining the core
702 essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(20):201900570.
- 703 16. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform.
704 *Bioinformatics*. 2010;26(5):589–95.
- 705 17. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment
706 of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.
- 707 18. DeJesus MA, Ambadipudi C, Baker R, Sassetti C, Ioerger TR. TRANSIT - A Software tool
708 for Himar1 TnSeq analysis. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(10):e1004401.
- 709 19. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, et al. An ordered,
710 nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants.
711 *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(8):2833–8.
- 712 20. Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of
713 *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(13):4110–
714 5.
- 715 21. Lee SA, Gallagher LA, Thongdee M, Staudinger BJ, Lippman S, Singh PK, et al. General
716 and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*.
717 2015;112(16):5189–94.
- 718 22. Atomi H, Tomita H, Ishibashi T, Yokooji Y, Imanaka T. CoA biosynthesis in *archaea*.
719 *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):427–31.
- 720 23. Kumari A. Sweet biochemistry. 2018. 7–11 p.
- 721 24. Chandel NS. Amino acid metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
722 2021;13(4):a040584.
- 723 25. Reitzer L. Encyclopedia of microbiology (third edition). 2009.
- 724 26. Dolan SK, Kohlstedt M, Trigg S, Ramirez PV, Kaminski CF, Wittmann C, et al. Contextual
725 flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* central carbon metabolism during growth in single
726 carbon sources. *mBio*. 2020;11(2):e02684-19.
- 727 27. Peters JM, Koo BM, Patino R, Heussler GE, Hearne CC, Qu J, et al. Enabling genetic
728 analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nat Microbiol*. 2019;4(2):244–50.
- 729 28. Banta AB, Ward RD, Tran JS, Bacon EE, Peters JM. Programmable gene knockdown in
730 diverse bacteria using Mobile-CRISPRi. *Curr Protoc Microbiol*. 2020;59(1):e130.

- 731 29. Leonardi R, Jackowski S. Biosynthesis of pantothenic acid and Coenzyme A. *Ecosal Plus*.
732 2007;2(2).
- 733 30. Boechat AL, Kaihami GH, Politi MJ, Lépine F, Baldini RL. A novel role for an ECF sigma
734 factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS*
735 *ONE*. 2013;8(12):e84775.
- 736 31. Blanka A, Schulz S, Eckweiler D, Franke R, Bielecka A, Nicolai T, et al. Identification of
737 the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa*
738 pathogenicity. *J Bacteriol*. 2013;196(2):345–56.
- 739 32. Beld J, Lee DJ, Burkart MD. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and
740 metabolic engineering. *Mol Biosyst*. 2014;11(1):38–59.
- 741 33. Yuan Y, Sachdeva M, Leeds JA, Meredith TC. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas*
742 *aeruginosa* is initiated by the FabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J*
743 *Bacteriol*. 2012;194(19):5171–84.
- 744 34. Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo JD, et al. Diversity of β -
745 lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French
746 multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1763–71.
- 747 35. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery,
748 research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant
749 bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
- 750 36. Zhao L, Anderson MT, Wu W, Mobley HLT, Bachman MA. TnseqDiff: identification of
751 conditionally essential genes in transposon sequencing studies. *BMC Bioinform*.
752 2017;18(1):326.
- 753 37. Zomer A, Burghout P, Bootsma HJ, Hermans PWM, Hijum SAFT van. ESSENTIALS:
754 software for rapid analysis of high throughput transposon insertion sequencing data. *PLoS*
755 *ONE*. 2012;7(8):e43012.
- 756 38. McCoy KM, Antonio ML, Opijnen T van. MAgenta: a Galaxy implemented tool for
757 complete Tn-Seq analysis and data visualization. *Bioinformatics*. 2017;33(17):2781–3.
- 758 39. Solaimanpour S, Sarmiento F, Mrázek J. Tn-seq explorer: a tool for analysis of high-
759 throughput sequencing data of transposon mutant libraries. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126070.
- 760 40. Pritchard JR, Chao MC, Abel S, Davis BM, Baranowski C, Zhang YJ, et al. ARTIST: High-
761 resolution genome-wide assessment of fitness using transposon-insertion sequencing. *PLoS*
762 *Genet*. 2014;10(11):e1004782.
- 763 41. Burger BT, Imam S, Scarborough MJ, Noguera DR, Donohue TJ. Combining genome-scale
764 experimental and computational methods to identify essential genes in *Rhodobacter*
765 *sphaeroides*. *mSystems*. 2017;2(3):e00015-17.
- 766 42. Primerano DA, Burns RO. Metabolic basis for the isoleucine, pantothenate or methionine
767 requirement of *ilvG* strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1982;150(3):1202–11.

- 768 43. Jackowski S, Alix JH. Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease
769 (*panF*) gene of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1990;172(7):3842–8.
- 770 44. Sandoval CM, Ayson M, Moss N, Lieu B, Jackson P, Gaucher SP, et al. Use of pantothenate
771 as a metabolic switch increases the genetic stability of farnesene producing *Saccharomyces*
772 *cerevisiae*. Metab Eng. 2014;25:215–26.
- 773 45. Verschueren KHG, Blanchet C, Felix J, Dansercoer A, Vos DD, Bloch Y, et al. Structure
774 of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. Nature.
775 2019;568(7753):571–5.
- 776 46. Cabruja M, Lyonnet BB, Millán G, Gramajo H, Gago G. Analysis of coenzyme A activated
777 compounds in *actinomyces*. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(16):7239–48.
- 778 47. Wood LF, Ohman DE. Use of cell wall stress to characterize σ^{22} (AlgT/U) activation by
779 regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol.
780 2009;72(1):183–201.
- 781 48. Heath RJ, Rock CO. Roles of the FabA and FabZ β -hydroxyacyl-acyl carrier protein
782 dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. J Biol Chem. 1996;271(44):27795–
783 801.
- 784 49. Butman HS, Kotzé TJ, Dowd CS, Strauss E. Vitamin in the crosshairs: targeting
785 pantothenate and Coenzyme A biosynthesis for new antituberculosis agents. Front Cell Infect
786 Microbiol. 2020;10:605662.
- 787 50. Spry C, Kirk K, Saliba KJ. Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target. FEMS
788 Microbiol Rev. 2008;32(1):56–106.
- 789 51. Liyanage SI, Gupta M, Wu F, Taylor M, Carter MD, Weaver DF. Inhibition of pantothenate
790 synthetase by analogs of β -alanine precursor ineffective as an antibacterial strategy.
791 Chemotherapy. 2019;64(1):22–7.
- 792 52. Howieson VM, Zeng J, Kloehn J, Spry C, Marchetti C, Lunghi M, et al. Pantothenate
793 biosynthesis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites is not a drug target. Int J Parasitol: Drugs Drug
794 Resist. 2023;22:1–8.
- 795 53. Lunghi M, Kloehn J, Krishnan A, Varesio E, Vadas O, Soldati-Favre D. Pantothenate
796 biosynthesis is critical for chronic infection by the neurotropic parasite *Toxoplasma gondii*. Nat
797 Commun. 2022;13(1):345.
- 798 54. Muggeo A, Coraux C, Guillard T. Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction
799 with human airway epithelium. PLoS Pathog. 2023;19(3):e1011221.
- 800 55. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common
801 virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science.
802 1995;268(5219):1899–902.
- 803 56. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods.
804 2012;9(4):357–9.

- 805 57. Kechin A, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. cutPrimers: a new tool for accurate cutting
806 of primers from reads of targeted next generation sequencing. J Comput Biol.
807 2017;24(11):1138–43.
- 808 58. Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods
809 for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics.
810 2003;19(2):185–93.
- 811 59. Winsor GL, Rossum TV, Lo R, Khaira B, Whiteside MD, Hancock REW, et al.
812 *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of
813 microbial genomes. Nucleic Acids Res. 2009;37(suppl_1):D483–8.
- 814 60. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III
815 secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(22):8006–11.
- 816 61. Royer G, Roisin L, Demontant V, Lo S, Coutte L, Lim P, et al. Microdiversity of
817 *Enterococcus faecalis* isolates in cases of infective endocarditis: selection of non-synonymous
818 mutations and large deletions is associated with phenotypic modifications. Emerg Microbes
819 Infect. 2021;10(1):929–38.
- 820 62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
821 quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001;25(4):402–8.
- 822 63. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE
823 guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.
824 Clin Chem. 2009;55(4):611–22.
- 825 64. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C, Eliceiri KW, Schindelin J, Cardona A, et al.
826 Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification.
827 Bioinformatics. 2017;33(15):2424–6.

828

Supplementary data

Table S1: Bacterial strain used in this study

Strain	Genotype and characteristics	Reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14 WT	Reference strain (<i>P. aeruginosa</i> PA14 UCBPP)	L.G. Rahme (54)
PA14Δ <i>oprD</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA14 UCBPP with clean deletion of the <i>oprD</i> gene	D. Skurnik (11,12)
PA14/pRS2022005 (pEXG2Δ <i>fahA</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>fahA</i> gene for deletion in PA14	This work
PA14Δ <i>oprD</i> /pRS2022005 (pEXG2Δ <i>fahA</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>fahA</i> gene for deletion in PA14	This work
PA14Δ <i>fahA</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA14 UCBPP with clean deletion of the <i>fahA</i> gene	This work
PA14Δ <i>oprD</i> Δ <i>fahA</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA14 UCBPP with clean deletion of the <i>oprD</i> gene and <i>fahA</i> gene	This work
PA14/pRS2022006 (pEXG2Δ <i>panC</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>panC</i> gene for deletion in PA14	This work
PA14Δ <i>oprD</i> /pRS2022006 (pEXG2Δ <i>panC</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>panC</i> gene for deletion in PA14	This work
PA14 WT/ pJMP1237::sg_CTL	CRISPRi module with sgRNA with non-targeting spacer in plasmid pJMP1237 and integrated into the PA14 chromosome at att Tn7 after the <i>glmS</i> gene (6.516.367-6.518.202).	This work
PA14 Δ <i>oprD</i> / pJMP1237::sg_CTL	CRISPRi module with sgRNA with non-targeting spacer in plasmid pJMP1237 and integrated into the PA14 chromosome at att Tn7 after the <i>glmS</i> gene (6.516.367-6.518.202).	This work
PA14 WT/ pJMP1237::sg_ <i>panC</i>	CRISPRi module with sgRNA targeting the <i>panC</i> gene constructed in the plasmid pJMP1237 and integrated into the PA14 chromosome at att Tn7 after the <i>glmS</i> gene (6.516.367-6.518.202).	This work
PA14Δ <i>oprD</i> / pJMP1237::sg_ <i>panC</i>	CRISPRi module with sgRNA targeting the <i>panC</i> gene constructed in the plasmid pJMP1237 and integrated into the PA14 chromosome at att Tn7 after the <i>glmS</i> gene (6.516.367-6.518.202).	This work
PA14 WT /pJMP1237::sg_ <i>fahA</i>	CRISPRi module with sgRNA targeting the <i>fahA</i> gene constructed in the plasmid pJMP1237 and integrated into the PA14 chromosome at att Tn7 after the <i>glmS</i> gene (6.516.367-6.518.202).	This work
PA14Δ <i>oprD</i> /pJMP1237::sg_ <i>fahA</i>	CRISPRi module with sgRNA targeting the <i>fahA</i> gene constructed in the plasmid pJMP1237 and integrated into the	This work

PA14 chromosome at att Tn7 after the *glmS* gene (6.516.367-6.518.202).

<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α /pEXG2	Strain with the native plasmid pEXG2	
<i>E. coli</i> DH5 α /pRS2022005 (pEXG2 Δ <i>fahA</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>fahA</i> gene for deletion in PA14	This work
<i>E. coli</i> DH5 α /pRS2022006 (pEXG2 Δ <i>panC</i>)	Strain with a pEXG2 plasmid containing the Up and Down sequences of <i>panC</i> gene for deletion in PA14	This work
<i>E. coli</i> MFD DAP- <i>pir</i> ⁺ /pJMP1237	Strain used as donor for tri-parental mating with the plasmid containing the CRISPRi module.	This work
MFD DAP- <i>pir</i> ⁺ /pJMP1039	Strain used as donor for tri-parental mating with the plasmid containing transposase.	This work

4

5

6 **Table S2: Quality metrics obtained with the Transit stats function from WIG files**
 7 **generated with bowtie mapper**

	S1_RUN1	S3_RUN1	S1	S2	S5	S6
Number of reads	8 003,192	8 713,300	6 806,023	10 967,540	9 955,879	1 148,038
Mapped_read	6 714,836	7 269,135	5 059,919	8 860,617	7 197,141	786,779
%mapped_reads	83.90	83.43	74.34	80.9	72.29	68.53
Density	0.599	0.661	0.643	0.659	0.674	0.539
mean_CT	66.4	71.9	50.0	87.6	71.2	7.8
NZ_mean	110.9	108.8	77.8	132.9	105.7	14.4
NZmedian	56	51	35	55	47	6
Max_ct	3284	3942	10661	17109	4579	964
Total_cts	6 704,929	7 259,889	5 049,342	8 841,568	7 187,530	785,172
Skewness	4.1	4.4	14.7	11.9	4.9	6.6
Kurtosis	30.4	36.9	857.8	590.6	46.6	98.8
Pickands_tail_index	0.155	0.133	0.182	0.237	0.245	0.271

8

9

10 **Table S3: Quality metrics obtained with the Transit stats function from WIG files**
 11 **generated with BWA**

	S1_RUN1	S3_RUN1	S1	S2	S5	S6
#reads	8003192	8713300	6806023	10967540	9955879	1148038
#trimmed_reads	8002396	8712179	6805509	10966681	9954917	1147948
#mapped_reads	7573647	8100871	5927151	10068452	8444399	938621
%reads_mapped	94.63	92.97	87.09	91.80	84.82	81.76
density	0.660	0.720	0.693	0.719	0.730	0.571
mean_ct	73.5	78.5	55.9	96.3	78.4	8.7
NZmean	111.3	109.0	80.8	133.9	107.5	15.3
NZmedian	53	48	34	52	45	6
max_ct	235553.0	160437.0	185711.0	251729.0	115348.0	20780.0
total_cts	7420002	7919795	5645965	9717220	7916904	880388
skewness	246.9	240.5	248.0	246.4	194.8	200.6
kurtosis	62785.3	62356.3	64124.8	64368.2	46652.0	45145.6
pickands_tail_index	0.173	0.186	0.630	0.551	0.537	0.605

12

13

14 **Table S4: Summary of the studies on essential genes in *P. aeruginosa***

Dataset	Year	#EG	Strain	Media	Ref
Liberati	2006	335	PA14	LB	(19)
Skurnik	2013	636	PA14	LB	(11)
Turner	2015	314	PA14	BHI Agar	(20)
Lee	2015	314	PAO1	LB	(21)
Poulsen	2019		PA14	LB	(65)
<i>FWER</i>		437			
<i>FDR</i>		596			
<i>TRANSIT</i>		316			
<i>CORE</i>		321	Core pangenome <i>P. aeruginosa</i>		
<i>Small</i>		93	Intersection of 5 pangenomes studies		

15

16 Table S5: Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Reference
Gene deletion		
pEXG2	Allelic exchange vector with pBR origin, gentamicin resistance, <i>sacB</i>	Arne Rietsch (60)
pEXG2::Δ<i>fahA</i>	pEXG2 containing the Up and Down sequences (500bp) of <i>fahA</i> gene of PA14 for deletion	This work
pEXG2::Δ<i>panC</i>	pEXG2 containing the Up and Down sequences (500bp) of <i>panC</i> gene of PA14 for deletion	This work
CRISPRi/dCas9		
pJMP1039	Plasmid containing the transposase allowing the integration of the CRISPRi module into the PA14 genome	Gift from Carol Gross & Jason Peters & Oren Rosenberg
pJMP1237	Plasmid containing the CRISPRi module framed by Tn7 restriction sites. Gentamicin resistance gene associated with the CRISPRi module.	Gift from Carol Gross & Jason Peters & Oren Rosenberg
pJMP1237::sg_CTL	pJMP1237 containing the 20bp non targeting spacer in PA14 to use as control during inhibition conditions	This work
pJMP1237::sg_ <i>panC</i>	pJMP1237 containing the 20bp spacer of the PA14 <i>panC</i> gene for inhibition of the gene by CRISPRi	This work
pJMP1237::sg_ <i>fahA</i>	pJMP1237 containing the 20bp spacer of the PA14 <i>fahA</i> gene for inhibition of the gene by CRISPRi	This work

17

18 Table S6: List of the primers used for RT-qPCR

Primer	Sequence	Use
DYH115	5' CAT-AAT-ATC-TCA-TTT-CAC-TAA-ATA-ATA-GTG-AAC-GGC-AGG-TAA-GC 3'	Use to check fragments in pEXG2-designed by DYH
DYH116	5' CAT-TCT-GCT-AAC-CAG-TAA-GGC-AAC-CCC-G 3'	To check fragments in pEXG2-designed by DYH
PA14_pEXG2_F	5' AGC-TCG-AAT-TCG-GTA-CCT-TAA-TTA-ATT-TC 3'	Primers for gene deletion with PEXG2 by Gibson Assembly
PA14_pEXG2_R	5' CCG-GGG-ATC-CTC-TAG-AGT-C 3'	Primers for gene deletion with PEXG2 by Gibson Assembly
<i>fahA</i> up_fwd	5' CGA-CTC-TAG-AGG-ATC-CCC-GGG-AGC-TTG-ACC-ACT-CGC-CG 3'	Primer for <i>fahA</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping PA14_pEXG2_R
<i>fahA</i> up_rev	5' AGA-GCT-TCA-TGG-GGT-TAT-CTC-CGT-TGC-G 3'	Primer for <i>fahA</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping <i>fahA</i> _down
<i>fahA</i> down_fwd	5' AGA-TAA-CCC-CAT-GAA-GCT-CTA-TAC-CTA-CCG-TTC-CAC-CTC 3'	Primer for <i>fahA</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping <i>fahA</i> _up
<i>fahA</i> down_rev	5' TAA-GGT-ACC-GAA-TTC-GAG-CTG-TGG-CCA-GGC-GTC-CAG-CG 3'	Primer for <i>fahA</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping PA14_pEXG2_F
<i>panC</i> up_fwd	5' CGA-CTC-TAG-AGG-ATC-CCC-GGC-CTG-GCC-TTC-GAA-TCC-AG 3'	Primer for <i>panC</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping PA14_pEXG2_R
<i>panC</i> up_rev	5' TCG-GCA-TGC-GTC-ATG-CGT-TGA-ATC-CGT-G 3'	Primer for <i>panC</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping <i>panC</i> _down
<i>panC</i> down_fwd	5' CAA-CGC-ATG-ACG-CAT-GCC-GAG-CCC-CCG-G 3'	Primer for <i>panC</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping <i>panC</i> _up
<i>panC</i> down_rev	5' TAA-GGT-ACC-GAA-TTC-GAG-CTG-TTG-GAA-TTC-GAT-GGC-GCA-CTT-ATT-TGA-ACA-TGA-AAA-AGC-C 3'	Primer for <i>panC</i> deletion in PA14 by Gibson Assembly, overlapping PA14_pEXG2_F
<i>fahA</i> gene_F	5' CTG-TCT-GCT-CAA-CGA-CTG 3'	Primers for verification of the deletion of <i>fahA</i> gene
<i>fahA</i> gene_R	5' CGT-TGT-CGT-CGT-AAA-GAT-AC 3'	Primers for verification of the deletion of <i>fahA</i> gene
<i>panC</i> gene_F	5' AGA-CCG-TCC-CTG-AAC-TG 3'	Primers for verification of the deletion of <i>panC</i> gene
<i>panC</i> gene_R	5' GGT-ATG-TGT-CCA-GGT-CTT-C 3'	Primers for verification of the deletion of <i>panC</i> gene
<i>sigX_F</i>	5' AAC-CAG-AAT-CTC-CCG-ATC-TA 3'	Primers for verification of the deletion of <i>fahA</i> gene

<i>sigX_R</i>	5' GCA-AGT-CGA-AGT-TCA-AAA-CA 3'	Primers for verification of the deletion of <i>fabA</i> gene
<i>algU_F</i>	5' GGT-ATT-CAA-CTG-GGT-GAA-CT 3'	Primers for verification of the deletion of <i>panC</i> gene
<i>algU_R</i>	5' CAA-GTT-CGA-TCC-TTC-CCA-A 3'	Primers for verification of the deletion of <i>panC</i> gene
<i>cmpX_F</i>	5' GAC-GTA-GAT-TCC-TGC-AAT-GA 3'	Primer for RT- PCR of <i>sigX</i> gene
<i>cmpX_R</i>	5' GGT-CAT-CAT-CAT-CAG-CAT-CT 3'	Primer for RT- PCR of <i>sigX</i> gene
<i>cmaX_F</i>	5' AGG-AAA-AAG-CCG-GTG-ATT-AT 3'	Primer for RT- PCR of <i>cmpX</i> gene
<i>cmaX_R</i>	5' GGG-ATA-TCT-ACT-CGC-AAC-TG 3'	Primer for RT- PCR of <i>cmpX</i> gene
<i>fabD_F</i>	5' CAG-GTA-GTG-ATC-GCC-GGT 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabD</i> gene
<i>fabD_R</i>	5' CAG-CGT-ATC-GAG-ATC-AGC 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabD</i> gene
<i>fabG_F</i>	5' CCA-ACC-TGA-ACA-GTC-TCT-AC 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabG</i> gene
<i>fabG_R</i>	5' ATT-CAC-GGT-AAT-GGC-ACG 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabG</i> gene
<i>fabY_F</i>	5' GAA-GGG-TAT-CGA-CGT-CAT-C 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabY</i> gene
<i>fabY_R</i>	5' TCC-ATC-AGC-ACT-ACG-TAC-T 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabY</i> gene
<i>fabZ_F</i>	5' CTC-ATC-GCT-ATC-CTT-TCC-TG 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabZ</i> gene
<i>fabZ_R</i>	5' GCA-TCT-TGA-AAC-CGA-GGA-TA 3'	Primer for RT- PCR of <i>fabZ</i> gene
<i>gyrB_F</i>	5' AGC-TAC-GTC-ACC-TTC-AAC-CG 3'	Primer for RT- PCR of <i>gyrB</i> gene
<i>gyrB_R</i>	5' ACA-GCT-GCT-CAG-GGT-TCA-TC 3'	Primer for RT- PCR of <i>gyrB</i> gene

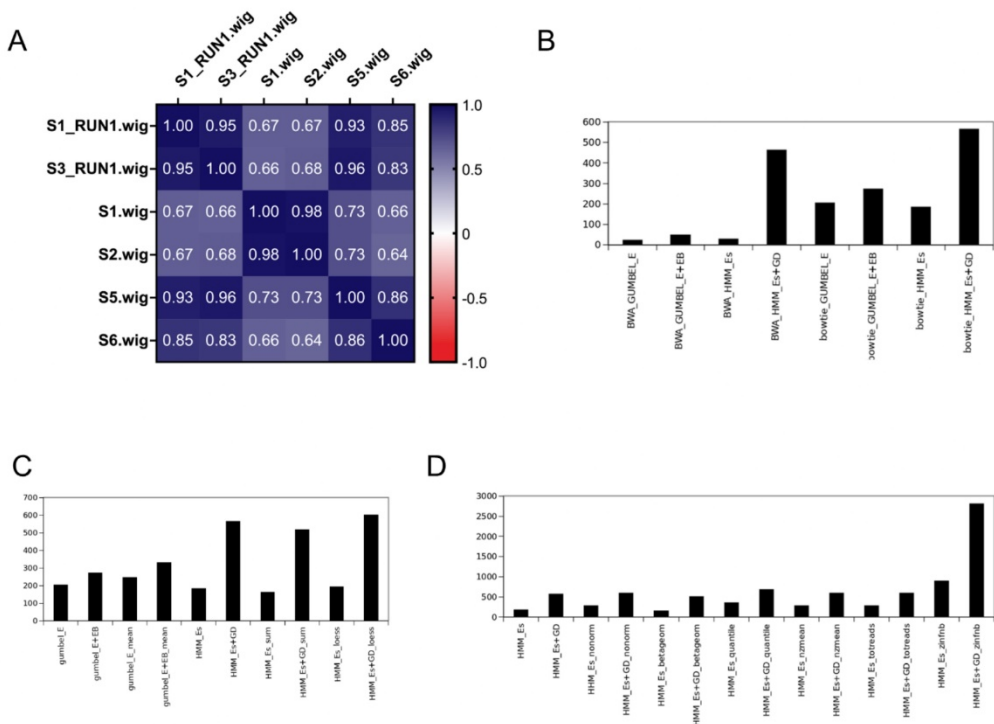


Figure S1: Assessment of methods for TnSeq data analysis. (A) Correlation matrix (Pearson coefficients) between the six samples used in TnSeq. Data were obtained with the corplot R package from WIG file, plotted with GraphPad Prism. Dark blue represents highest correlation between two samples. (B) Impact of the mapper on EGs determination represented by the number of EGs identified with BWA and bowtie. (C) Impact of software parameters on EGs determination represented by the number of EGs identified with BWA and bowtie. (D) Impact of normalization on EGs determination represented by the number of EGs identified with BWA and bowtie. EG = Essential class, EB= Binomial class and GD = Growth Defect class.

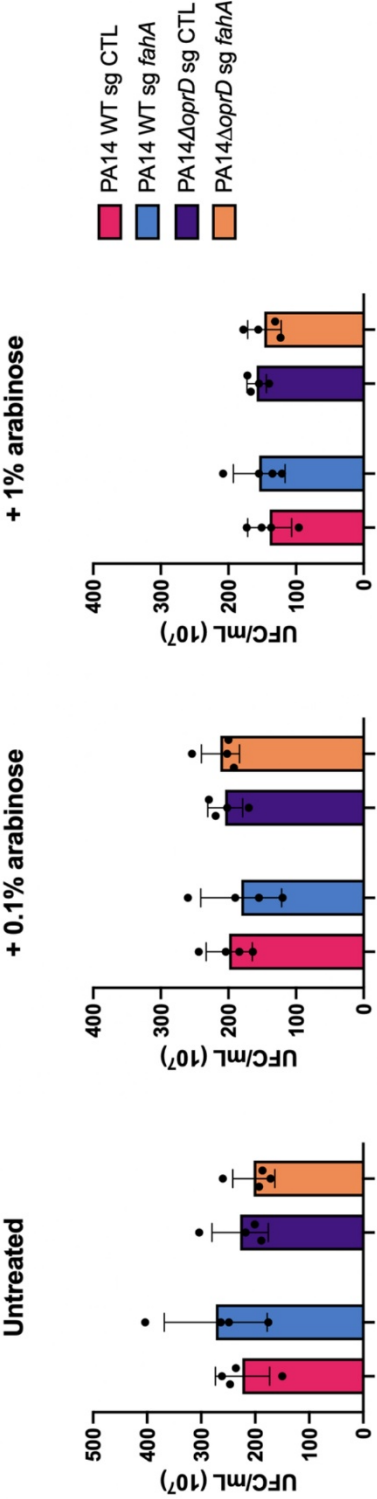
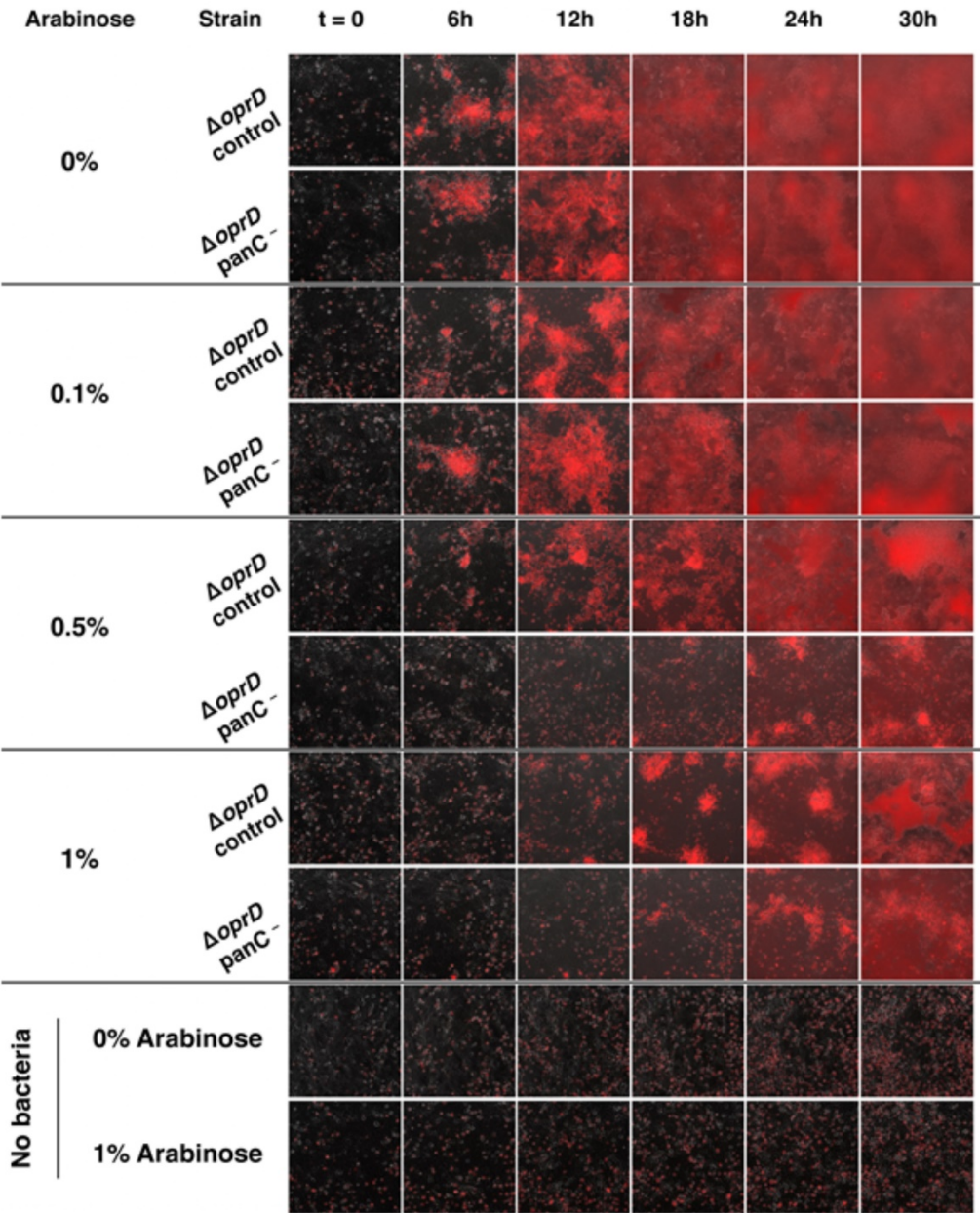


Figure S2: Biological invalidation of *fahA* essentiality for PA14ΔoprD. Colony count of the PA14 CRISPRi strains after culture in LB media supplemented with various concentration of arabinose (0.1% or 1%) for 6 hours (n=4). Statistics were achieved by Mann-Whitney test.

34



35

36 **Figure S3: 16HBE cells dynamics of cell death following infection by CRISPRi PA14 strains.**
37 Dynamics of cell death of 16HBE bronchial epithelial cells, infected by CRISPRi PA14 WT control,
38 CRISPRi PA14 WT sg *panC*, CRISPRi PA14 $\Delta oprD$ control and CRISPRi PA14 $\Delta oprD$ sg *panC*
39 strains. Images were taken using phase contrast microscopy and fluorescence microscopy (x20
40 objective). Cell death is visualized by the mortality marker propidium iodide (in red).

41

DISCUSSION ET CONCLUSION

Discussion générale

P. aeruginosa résistant aux carbapénèmes fait partie des souches pour lesquelles le développement de nouveaux antimicrobiens est primordial (1,179). La perte de la porine OprD est un des facteurs entraînant l'apparition de cette résistance mais elle confère également un meilleur fitness et une virulence accrue *in vivo* (4–6,180). L'objectif principal de ce travail était donc de définir par Tn-Seq une liste de gènes essentiels spécifiques à la souche PA14 OprD mutant puis de vérifier biologiquement leur essentialité au travers de délétions et inhibitions de gènes par approche CRISPRi afin de mettre en lumière des gènes pouvant s'avérer être de nouvelles cibles thérapeutiques.

De nombreux outils ont été développés pour l'analyse des résultats de Tn-Seq tels que TnseqDiff (181) ESSENTIAL (182), Magenta (183), Tn-seq Explorer (184), ARTIST (185), TRANSIT (186), TSAS (187) ou encore FiTnEss, faite pour définir les gènes essentiels chez *P. aeruginosa* (23). Nous avons d'abord validé la méthode analytique des résultats de Tn-Seq en établissant deux listes de gènes essentiels de référence (gold standard ; GS) d'après les listes de gènes publiées dans la littérature (4,23,130,136). L'utilisation de ces GS nous a permis de déterminer que pour nos échantillons, FiTnEss était le logiciel le plus adapté. Nous avons ainsi obtenu les listes de GE pour les souches PA14 WT et PA14 Δ *oprD*, pour laquelle nous avons isolé une liste de 30 GE spécifiques à PA14 OprD mutant.

Nous avons porté notre attention sur deux gènes retrouvés dans cette liste, *fahA* et *panC*. Ces deux gènes sont des précurseurs d'intermédiaires du cycle de Krebs et semblaient donc être une piste intéressante puisqu'ils sont impliqués dans le fonctionnement de voies métaboliques importantes pour les bactéries. Nous avons invalidé le caractère essentiel de *fahA* par délétion, mais pas pour *panC*. Nous avons alors utilisé une méthode CRISPRi permettant l'inhibition inductible de l'expression de gènes. L'inhibition de *panC* a un fort impact négatif sur la croissance de PA14 Δ *oprD* *in vitro*. Puisque cette méthode n'inhibe pas totalement l'expression du gène contrairement à une délétion, nous ne pouvons pas affirmer l'essentialité stricte de *panC*, mais les résultats obtenus convergent en ce sens.

panC étant un gène codant pour une pantothénate synthétase, il permet la production de pantothénate par la bactérie. Le pantothénate est nécessaire à la production de Coenzyme A, et il a été décrit dans la littérature qu'une supplémentation en pantothénate cause une augmentation dans la synthèse de molécules nécessitant des intermédiaires du Coenzyme A (188–190). Ainsi, puisque le Coenzyme A est nécessaire au cycle de Krebs, un défaut de pantothénate pourrait alors impacter cette voie métabolique ainsi que celles en découlant (191,192). Notre première hypothèse était que donc que l'inhibition de *panC* pourrait induire une baisse de l'obtention d'AA, ne compensant plus le manque d'import de ces derniers par la porine OprD. En milieu minimum, la supplémentation en AA n'expliquait cependant pas à elle seule l'impact de l'inhibition de *panC* chez PA14 Δ *oprD*.

Pour notre seconde hypothèse, il est décrit que la porine majoritaire chez *P. aeruginosa*, OprF, joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane (90). OprD étant la seconde porine majoritaire, nous avons alors supposé qu'elle pouvait également être impliquée dans la structure de la membrane externe de PA14. Ainsi, chez PA14 Δ *oprD* présentant une membrane possiblement déjà altérée, l'absence de *panC* qui préside à la production du pantothénate nécessaire à la production de Coenzyme A, lui-même nécessaire à la production d'AG, pourrait altérer d'autant plus cette membrane et induire une perte de viabilité cellulaire. Nous avons démontré que lorsque l'expression de *panC* était éteinte par CRISPRi chez PA14 Δ *oprD*, on observait une diminution d'expression des gènes *sigX* et *cmpX*, impliqués dans la réponse au stress de membrane et dans la régulation des gènes de synthèse des AG, mais également de celle de gènes de synthèse des AG (*fabD*, *fabG*, *fabY* et *fabZ*). L'ensemble des résultats obtenus indique que l'essentialité de *panC* chez PA14 Δ *oprD* serait due à une altération d'homéostasie de la membrane liée à un déséquilibre dans le ratio entre AG saturés et insaturés à la membrane en faveur d'une augmentation de la rigidité membranaire lorsque ce gène est inhibé.

La voie de synthèse du pantothénate est absente chez l'homme, faisant de cette voie une cible spécifique des bactéries. L'idée de l'utiliser comme cible thérapeutique a déjà été mise en avant mais remise en question par l'absence de résultats concluants via l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs de la pantothénate synthétase (149,153,154,193). Cependant, il a été récemment décrit que la synthèse de Coenzyme A était nécessaire à *Toxoplasma gondii* en phase tachyzoite, ce qui suggère que la synthèse de pantothénate est une cible pertinente contre ce parasite (155). Ces résultats nous ont encouragé à étudier l'impact de l'inhibition de *panC*

dans un contexte infectieux en utilisant un modèle de cellules bronchiques cultivées en monocouche (16HBE). Nous avons ainsi mis en évidence que l'inhibition de *panC* entraîne une diminution de la virulence vis-à-vis des cellules par rapport à la souche PA14 Δ *oprD* non inhibée pour *panC*. Ce résultat renforce l'idée que cibler la voie de synthèse du pantothénate chez des souches résistante aux carbapénèmes par la perte de la porine OprD pourrait être une alternative thérapeutique pour traiter les patients infectés.

Conclusion et perspectives

Lors de ce travail, nous avons déterminé des GS de GE permettant la discrimination des différentes méthodes d'analyse pour des données de Tn-Seq. Cela nous a permis de déterminer les GE de la souche PA14 Δ *oprD* *in vitro*. Nous avons également investigué les raisons de l'essentialité d'un de ces gènes, *panC*. L'ensemble des résultats obtenus révèle le potentiel de *panC* en tant que cible thérapeutique pour le traitement d'infections à *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes par perte de la porine OprD.

En perspective à ce travail, il semble nécessaire d'investiguer plus en profondeur l'altération supposée de la membrane de *P. aeruginosa* OprD mutant avec et sans inhibition de *panC*. Pour cela, des tests de mesure d'anisotropie seront réalisés sur les souches sauvages de PA14 et les souches CRISPRi. Ces tests d'anisotropie évalueront la rigidité de la membrane, et nous permettront de confirmer la modification de la fluidité de membrane pour PA14 Δ *oprD* et son accentuation lorsque *panC* est inhibé.

De plus, nous réaliserons une analyse lipidomique de la membrane bactérienne afin de pouvoir quantifier les AG saturés et insaturés la constituant et vérifier le ratio d'AG dans le cas d'une inhibition de *panC* chez PA14 OprD mutant.

Afin de renforcer nos résultats indiquant la baisse de virulence de PA14 Δ *oprD* en cas d'inhibition de *panC*, nous confirmerons les observations obtenues sur notre modèle d'infection 16HBE avec d'autres lignées cellulaires en monocouche. Cette preuve de concept pourra ensuite être vérifiée dans un modèle d'épithélium pleinement différencié des voies respiratoires humaines par culture de cellules primaires de patients en interface air-liquide.

Pour finir, nous avons également réalisé un Tn-Seq sur les souches PA14 WT et PA14 Δ *oprD* lors d'infections d'épithélium des voies aériennes cultivé en interface air-liquide afin de déterminer les GE de ces souches dans un contexte infectieux. Les résultats sont en cours d'analyse. Ils nous permettront de mettre en évidence des GE spécifiques à PA14 Δ *oprD* propre à l'infection d'épithélium respiratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(1):1-12.
2. Walter J, Haller S, Quinten C, Kärki T, Zacher B, Eckmanns T, et al. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. Eurosurveillance. 2018;23(32):1700843.
3. Muggeo A, Coraux C, Guillard T. Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. PLoS Pathog. 2023;19(3):e1011221.
4. Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, Lory S, et al. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries. PLoS Pathog. 2013;9(9):e1003582.
5. Skurnik D, Roux D, Cattoir V, Danilchanka O, Lu X, Yoder-Himes DR, et al. Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. Proc Natl Acad Sci. 2013;110(51):20747-52.
6. Roux D, Danilchanka O, Guillard T, Cattoir V, Aschard H, Fu Y, et al. Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. Sci Transl Med. 2015;7(297):297ra114-297ra114.
7. HUGH R, LEIFSON E. The proposed Neotype Strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. Int J Syst Evol Microbiol. 1964;14(2):69-84.
8. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology+. 2020;166(1):30-3.
9. Palleroni NJ. Bergey's Manual of Systematics of *Archaea* and Bacteria. 2020;1-1.
10. Genus: *Pseudomonas* [Internet]. [cité 1 oct 2023]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>
11. Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, Noort V van, et al. The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. Microorganisms. 2021;9(8):1766.
12. Caiazza NC, Shanks RMQ, O'Toole GA. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2005;187(21):7351-61.
13. Kazmierczak BI, Schniederberend M, Jain R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. Curr Opin Microbiol. 2015;28:78-82.

14. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Part 6: Disseminating Bact Infect. 2015;753-67.
15. Nizer WS da C, Inkovskiy V, Versey Z, Strempele N, Cassol E, Overhage J. Oxidative Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. Pathogens. 2021;10(9):1187.
16. Lindhout T, Lau PCY, Brewer D, Lam JS. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. Microbiology. 2009;155(10):3449-60.
17. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Protoc Microbiol. 2012;25(1):6E.1.1-6E.1.8.
18. Cox CD, Parker J. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1979;9(4):479-84.
19. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(1):29-70.
20. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. Front Microbiol. 2011;2:150.
21. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000;406(6799):959-64.
22. Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X, Hocquet D. What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. PLoS ONE. 2015;10(5):e0126468.
23. Poulsen BE, Yang R, Clatworthy AE, White T, Osmulski SJ, Li L, et al. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci. 2019;116(20):201900570.
24. Arai H. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2011;2:103.
25. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Eldere JV, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Population Structure Revisited. Plos One. 2009;4(11):e7740.
26. Shrivastava R, Upreti RK, Jain SR, Prasad KN, Seth PK, Chaturvedi UC. Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Ecotoxicol Environ Saf. 2004;58(2):277-83.
27. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and Disease. 2013;67(3):159-73.
28. Ferguson MW, Maxwell JA, Vincent TS, Silva J da, Olson JC. Comparison of the exoS Gene and Protein Expression in Soil and Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 2001;69(4):2198-210.

29. Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SD, Vitanza-Jack VB. Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol. 1974;28(6):987-91.
30. Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. J Hazard Mater. 2009;169(1-3):1-15.
31. Pirnay J, Matthijs S, Colak H, Chablain P, Bilocq F, Eldere JV, et al. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. Environ Microbiol. 2005;7(7):969-80.
32. Mena KD, Gerba CP. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201. Rev Environ Contam Toxicol. 2009;201:71-115.
33. Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M, Elborn JS. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. Commun Dis public Heal. 2002;5(1):23-6.
34. Purdy-Gibson ME, France M, Hundley TC, Eid N, Remold SK. *Pseudomonas aeruginosa* in CF and non-CF homes is found predominantly in drains. J Cyst Fibros. 2015;14(3):341-6.
35. Plotnikova JM, Rahme LG, Ausubel FM. Pathogenesis of the Human Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in Arabidopsis. Plant Physiol. 2000;124(4):1766-74.
36. Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, et al. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(16):8815-21.
37. Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci. 1999;96(5):2408-13.
38. Kaito C, Murakami K, Imai L, Furuta K. Animal infection models using non-mammals. Microbiol Immunol. 2020;64(9):585-92.
39. Algammal AM, Mabrok M, Sivaramasamy E, Youssef FM, Atwa MH, El-kholy AW, et al. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. Sci Rep. 2020;10(1):15961.
40. Sala A, Ianni FD, Pelizzone I, Bertocchi M, Santospirito D, Rogato F, et al. The prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in healthy captive ophidian. PeerJ. 2019;7:e6706.
41. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. Cells. 2023;12(1):199.
42. (AHAW) EP on AH and W, Nielsen SS, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, et al. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in dogs and cats. EFSA J. 2022;20(5):e07310.

43. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009;73(4):338-44.
44. Pham TM, Kretzschmar M, Bertrand X, Bootsma M, Consortium CM. Tracking *Pseudomonas aeruginosa* transmissions due to environmental contamination after discharge in ICUs using mathematical models. PLoS Comput Biol. 2019;15(8):e1006697.
45. Blanc DS, Francioli P, Zanetti G. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units – A Review. Open Microbiol J. 2007;1(1):8-11.
46. Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, et al. Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. J Appl Microbiol. 2008;105(5):1491-501.
47. Zepp JA, Morrissey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019;20(9):551-66.
48. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. Chest. 2018;154(1):169-76.
49. B Francisco Pérez, G Andrea Mendez, R Andrea Lagos, M Ssergio L Vargas. Dinámica y patología del barridomucociliar como mecanismodefensivo del pulmón y alternativasfarmacológicas de tratamiento. Rev mdica Chile. 2014;142(5):606-15.
50. Wang C, Cassandras M, Peng T. The Role of Hedgehog Signaling in Adult Lung Regeneration and Maintenance. J Dev Biol. 2019;7(3):14.
51. Naehrig S, Chao CM, Naehrlich L. Cystic Fibrosis. Dtsch Ärzteblatt Int. 2017;114(33-34):564-74.
52. Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery. Genes. 2020;11(6):589.
53. About Cystic Fibrosis | Cystic Fibrosis Foundation [Internet]. [cité 12 août 2023]. Disponible sur : <https://www.cff.org/intro-cf/about-cystic-fibrosis>
54. Férec C, Scotet V, Beucher J, Corvol H. Génétique et gènes modificateurs, formes atypiques et rares. Arch Pédiatrie. 2012;19:S3-7.
55. Mucoviscidose · Inserm, La science pour la santé [Internet]. [cité 12 août 2023]. Disponible sur : <https://www.inserm.fr/dossier/mucoviscidose/>
56. Tout savoir sur la mucoviscidose [Internet]. [cité 2023 août 12]. Disponible sur : <https://www.frm.org/recherches-maladies-rares/mucoviscidose/focus-mucoviscidose>
57. Registre Français de la Mucoviscidose Bilan des données 2022 [Internet]. [cité 12 août 2023]. Disponible sur : https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_francais_mucoviscidose_bilan2022.pdf

58. Rowntree RK, Harris A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Hum Genet.* 2003;67(5):471-85.
59. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol Rev.* 1999;79(1):S23-45.
60. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, et al. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(20):9262-6.
61. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373(9678):1891-904.
62. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):174.
63. Meskini M, Siadat SD, Seifi S, Movafagh A, Sheikhpour M. An Overview on the Upper and Lower Airway Microbiome in Cystic Fibrosis Patients. *Tanaffos.* 2020;20(2):86-98.
64. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Young Children with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis.* 2001;183(3):444-52.
65. Langan KM, Kotsimbos T, Peleg AY. Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(6):547-56.
66. Rossi E, Rosa RL, Bartell JA, Marvig RL, Haagenzen JAJ, Sommer LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(5):331-42.
67. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(3).
68. Criner RN, Han MK. COPD Care in the 21st Century: A Public Health Priority. *Respir Care.* 2018;63(5):591-600.
69. Hangaard S, Helle T, Nielsen C, Hejlesen OK. Causes of misdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic scoping review. *Respir Med.* 2017;129:63-84.
70. López-Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD. *Respirology.* 2016;21(1):14-23.
71. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(1):15076.
72. Higham A, Quinn AM, Cançado JED, Singh D. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions. *Respir Res.* 2019;20(1):49.
73. Aghapour M, Raei P, Moghaddam SJ, Hiemstra PS, Heijink IH. Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(2):157-69.

74. Cloonan SM, Lam HC, Ryter SW, Choi AM. “Ciliophagy”. *Autophagy*. 2014;10(3):532-4.
75. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2355-65.
76. Restrepo MI, Mortensen EM, Pugh JA, Anzueto A. COPD is associated with increased mortality in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*. 2006;28(2):346-51.
77. Murphy TF. The Many Faces of *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Infect Dis*. 2008;47(12):1534-6.
78. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Infect Dis*. 2008;47(12):1526-33.
79. Yum HK, Park IN, Shin BM, Choi SJ. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Lung Diseases: Relapse or Reinfection? *Tuberc Respir Dis*. 2014;77(4):172-7.
80. Papazian L, Klompas M, Luyt CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensiv Care Med*. 2020;46(5):888-906.
81. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(11):1999-2006.
82. Surveillance des infections associées aux dispositifs invasifs en 2020 [Internet]. [cité 16 sept 2023]. Disponible sur : <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/surveillance-des-infections-associees-aux-dispositifs-invasifs-en-2020>
83. Kalanuria AA, Ziai W, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit Care*. 2014;18(2):208.
84. Ramírez-Estrada S, Borgatta B, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect Drug Resist*. 2016;9:7-18.
85. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir care*. 2005;50(6):725-39; discussion 739-41.
86. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Méd Microbiol*. 2009;58(9):1133-48.
87. Fernández L, Hancock REW. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):661-81.
88. Koebnik R, Locher KP, Gelder PV. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. 2000;37(2):239-53.
89. Kumar A, Bhandari A, Krishnaswamy S. Sequence and Structural Perspectives of Bacterial β -Stranded Porins. *Protein Pept Lett*. 2014;22(1):8-22.

90. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(5):698-722.
91. Masi M, Winterhalter M, Pagès JM. Bacterial Cell Walls and Membranes. Subcell Biochem. 2019;92:79-123.
92. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019;37(1):177-92.
93. Hancock Rew, Woodruff WA. Roles of Porin and β -Lactamase in β -Lactam Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 1988;10(4):770-5.
94. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):4943-60.
95. Núñez LE, Méndez C, Braña AF, Blanco G, Salas JA. The Biosynthetic Gene Cluster for the β -Lactam Carbapenem Thienamycin in *Streptomyces cattleya*. Chem Biol. 2003;10(4):301-11.
96. Weaver SS, Bodey GP, LeBlanc BM. Thienamycin: New Beta-Lactam Antibiotic with Potent Broad-Spectrum Activity. Antimicrob Agents Chemother. 1979;15(4):518-21.
97. Brooks RG, McCabe RE, Vosti KL, Remington JS. Open Trial of Imipenem/Cilastatin Therapy for Serious Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 1985;7(Supplement_3):S496-505.
98. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):15-21.
99. Tahlan K, Jensen SE. Origins of the β -lactam rings in natural products. J Antibiot. 2013;66(7):401-10.
100. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med. 2012;18(5):263-72.
101. Kong K, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. 2010;118(1):1-36.
102. G Z George, E S Andrew, Lavern V, Lionell M, Group, the CCD. Imipenem and Meropenem: Comparison of In Vitro Activity, Pharmacokinetics, Clinical Trials and Adverse Effects. Can J Infect Dis Méd Microbiol. 1998;9(4):215-28.
103. Trias J, Nikaido H. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. J Biol Chem. 1990;265(26):15680-4.
104. Overview: oprD, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 [Internet]. [cité 12 sept 2023]. Disponible sur : <https://pseudomonas.com/feature/show?id=1659240>

105. Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, Berg B van den. Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(11):1108-9.
106. Huang H, Hancock RE. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1993;175(24):7793-800.
107. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Méd Microbiol.* 2012;302(2):63-8.
108. Muramatsu H, Horii T, Morita M, Hashimoto H, Kanno T, Maekawa M. Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Int J Méd Microbiol.* 2003;293(2-3):191-7.
109. Ochs MM, Lu CD, Hancock REW, Abdelal AT. Amino Acid-Mediated Induction of the Basic Amino Acid-Specific Outer Membrane Porin OprD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1999;181(17):5426-32.
110. Ducret V, Gonzalez MR, Scignari T, Perron K. OprD Repression upon Metal Treatment Requires the RNA Chaperone Hfq in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genes.* 2016;7(10):82.
111. Raavi, Mishra S, Singh S. Prevention of OprD regulated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Microb Pathog.* 2017;112:221-9.
112. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob agents Chemother.* 1999;43(5):1085-90.
113. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A Two-Component Regulatory System Interconnects Resistance to Polymyxins, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, and β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1211-21.
114. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.
115. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):893-903.
116. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(8):1772-80.
117. Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution.* 2001;55(1):1-24.
118. Wells JN, Feschotte C. A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annu Rev Genet.* 2020;54(1):1-23.

119. Craig NL. Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem.* 1997;66(1):437-74.
120. Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet.* 2011;12(9):615-27.
121. Kleckner N, Roth J, Botstein D. Genetic engineering in Vivo using translocatable drug-resistance elements New methods in bacterial genetics. *J Mol Biol.* 1977;116(1):125-59.
122. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc National Acad Sci.* 2003;100(24):14339-44.
123. Liu H, Price MN, Waters RJ, Ray J, Carlson HK, Lamson JS, et al. Magic Pools: Parallel Assessment of Transposon Delivery Vectors in Bacteria. *mSystems.* 2018;3(1):e00143-17.
124. Reimer LC, Spura J, Schmidt-Hohagen K, Schomburg D. High-Throughput Screening of a *Corynebacterium glutamicum* Mutant Library on Genomic and Metabolic Level. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e86799.
125. Lin T, Troy EB, Hu LT, Gao L, Norris SJ. Transposon mutagenesis as an approach to improved understanding of *Borrelia* pathogenesis and biology. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:63.
126. Kazi MI, Schargel RD, Boll JM. Generating Transposon Insertion Libraries in Gram-Negative Bacteria for High-Throughput Sequencing. *J Vis Exp.* 2020;(161).
127. Opijnen T van, Camilli A. Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(7):435-42.
128. Opijnen T van, Bodi KL, Camilli A. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods.* 2009;6(10):767-72.
129. Gallagher LA, Shendure J, Manoil C. Genome-Scale Identification of Resistance Functions in *Pseudomonas aeruginosa* Using Tn-seq. *Mbio.* 2011;2(1):e00315-10.
130. Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(13):4110-5.
131. Peng C, Lin Y, Luo H, Gao F. A Comprehensive Overview of Online Resources to Identify and Predict Bacterial Essential Genes. *Front Microbiol.* 2017;8:2331.
132. Koonin EV. How many genes can make a cell: The Minimal-Gene-Set Concept. *Genom Hum Genet.* 2000;1(1):99-116.
133. Juhas M. *Pseudomonas aeruginosa* essentials: an update on investigation of essential genes. *Microbiology+.* 2015;161(11):2053-60.
134. Fields FR, Lee SW, McConnell MJ. Using bacterial genomes and essential genes for the development of new antibiotics. *Biochem Pharmacol.* 2017;134:74-86.

135. Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A, Thiele I. A Systems Biology Approach to Drug Targets in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. PLoS ONE. 2012;7(4):e34337.
136. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(8):2833-8.
137. Lee SA, Gallagher LA, Thongdee M, Staudinger BJ, Lippman S, Singh PK, et al. General and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(16):5189-94.
138. Poulsen BE, Clatworthy AE, Hung DT. Essential Genes and Genomes, Methods and Protocols. Methods Mol Biol. 2021;2377:179-97.
139. Said HM. Water-Soluble Vitamins. World Rev Nutr Diet. 2014;111:30-7.
140. Webb ME, Smith AG, Abell C. Biosynthesis of pantothenate. Nat Prod Rep. 2004;21(6):695-721.
141. Howieson VM, Tran E, Hoegl A, Fam HL, Fu J, Sivonen K, et al. Triazole Substitution of a Labile Amide Bond Stabilizes Pantothenamides and Improves Their Antiplasmodial Potency. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(12):7146-52.
142. López-Sámano M, Beltrán LFL, Sánchez-Thomas R, Dávalos A, Villaseñor T, García-García JD, et al. A novel way to synthesize pantothenate in bacteria involves β -alanine synthase present in uracil degradation pathway. Microbiologyopen. 2020;9(4):e1006.
143. KEGG PATHWAY: Pantothenate and CoA biosynthesis - *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 [Internet]. [cité 24 sept 2023]. Disponible sur : <https://www.kegg.jp/pathway/pau00770>
144. Suresh A, Srinivasarao S, Khetmalis YM, Nizalapur S, Sankaranarayanan M, Sekhar KVGC. Inhibitors of pantothenate synthetase of *Mycobacterium tuberculosis* – a medicinal chemist perspective. RSC Adv. 2020;10(61):37098-115.
145. Frodyma ME, Downs D. ApbA, the Ketopantoate Reductase Enzyme of *Salmonella typhimurium* Is Required for the Synthesis of Thiamine via the Alternative Pyrimidine Biosynthetic Pathway. J Biol Chem. 1998;273(10):5572-6.
146. Overview: *panC*, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 [Internet]. [cité 24 sept 2023]. Disponible sur : <https://pseudomonas.com/feature/show/?id=1661042&view=overview>
147. Lane MD. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition). Metab Vitam Horm: Artic Titles: C. 2013;539-41.
148. Daugherty M, Polanuyer B, Farrell M, Scholle M, Lykidis A, Crécy-Lagard V de, et al. Complete Reconstitution of the Human Coenzyme A Biosynthetic Pathway via Comparative Genomics. J Biol Chem. 2002;277(24):21431-9.

149. Butman HS, Kotzé TJ, Dowd CS, Strauss E. Vitamin in the crosshairs: targeting pantothenate and Coenzyme A biosynthesis for new antituberculosis agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:605662.
150. Kumar P, Dubey KK. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. 2019;165-81.
151. Clarke SD, Nakamura MT. Encyclopedia of Biological Chemistry. Metab, Vitam Horm: Artic Titles: F. 2004;(Annu. Rev. Med.532002):99-103.
152. Istvan ES. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases: related enzymes with distinct architectures. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(6):746-51.
153. Liyanage SI, Gupta M, Wu F, Taylor M, Carter MD, Weaver DF. Inhibition of pantothenate synthetase by analogs of β -alanine precursor ineffective as an antibacterial strategy. *Chemotherapy.* 2019;64(1):22-7.
154. Spry C, Kirk K, Saliba KJ. Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(1):56-106.
155. Lunghi M, Kloehn J, Krishnan A, Varesio E, Vadas O, Soldati-Favre D. Pantothenate biosynthesis is critical for chronic infection by the neurotropic parasite *Toxoplasma gondii*. *Nat Commun.* 2022;13(1):345.
156. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids.* 2011;1811(11):637-47.
157. Klug L, Daum G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 2014;14(3):369-88.
158. Riedel SL, Lu J, Stahl U, Brigham CJ. Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(4):1469-83.
159. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap.* 2011;155(2):117-30.
160. Beld J, Lee DJ, Burkart MD. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst.* 2014;11(1):38-59.
161. Liang MH, Jiang JG. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):395-408.
162. Boechat AL, Kaihama GH, Politi MJ, Lépine F, Baldini RL. A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE.* 2013;8(12):e84775.
163. Kosa M, Ragauskas AJ. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends Biotechnol.* 2011;29(2):53-61.

164. Hu Z, Ma J, Chen Y, Tong W, Zhu L, Wang H, et al. *Escherichia coli* FabG 3-ketoacyl-ACP reductase proteins lacking the assigned catalytic triad residues are active enzymes. *J Biol Chem.* 2021;296:100365.
165. Heath RJ, Rock CO. Roles of the FabA and FabZ β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27795-801.
166. Heath RJ, Rock CO. Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (*fabI*) Plays a Determinant Role in Completing Cycles of Fatty Acid Elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26538-42.
167. Yuan Y, Sachdeva M, Leeds JA, Meredith TC. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the FabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J Bacteriol.* 2012;194(19):5171-84.
168. Eberlein C, Baumgarten T, Starke S, Heipieper HJ. Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(6):2583-93.
169. Funari SS, Barceló F, Escribá PV. Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *J Lipid Res.* 2003;44(3):567-75.
170. Ingraham LM, Burns CP, Boxer LA, Baehner RL, Haak RA. Fluidity properties and liquid composition of erythrocyte membranes in Chediak-Higashi syndrome. *J cell Biol.* 1981;89(3):510-6.
171. Nagy K, Tiuca ID. *Fatty Acids.* 2017;
172. Haines TH. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog Lipid Res.* 2001;40(4):299-324.
173. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005;438(7068):612-21.
174. Hąc-Wydro K, Wydro P. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chem Phys Lipids.* 2007;150(1):66-81.
175. Brinkman FSL, Schoofs G, Hancock REW, Mot RD. Influence of a Putative ECF Sigma Factor on Expression of the Major Outer Membrane Protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol.* 1999;181(16):4746-54.
176. Bouffartigues E, Gicquel G, Bazire A, Bains M, Maillot O, Vieillard J, et al. Transcription of the oprF Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced. *J Bacteriol.* 2012;194(16):4301-11.

177. Gicquel G, Bouffartigues E, Bains M, Oxaran V, Rosay T, Lesouhaitier O, et al. The Extra-Cytoplasmic Function Sigma Factor SigX Modulates Biofilm and Virulence-Related Properties in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE. 2013;8(11):e80407.
178. Blanka A, Schulz S, Eckweiler D, Franke R, Bielecka A, Nicolai T, et al. Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. J Bacteriol. 2013;196(2):345-56.
179. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318-27.
180. Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo JD, et al. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2013;68(8):1763-71.
181. Zhao L, Anderson MT, Wu W, Mobley HLT, Bachman MA. TnseqDiff: identification of conditionally essential genes in transposon sequencing studies. BMC Bioinform. 2017;18(1):326.
182. Zomer A, Burghout P, Bootsma HJ, Hermans PWM, Hijum SAFT van. ESSENTIALS: software for rapid analysis of high throughput transposon insertion sequencing data. PLoS ONE. 2012;7(8):e43012.
183. McCoy KM, Antonio ML, Opijnen T van. MAGenTA: a Galaxy implemented tool for complete Tn-Seq analysis and data visualization. Bioinformatics. 2017;33(17):2781-3.
184. Solaimanpour S, Sarmiento F, Mrázek J. Tn-seq explorer: a tool for analysis of high-throughput sequencing data of transposon mutant libraries. Plos One. 2015;10(5):e0126070.
185. Pritchard JR, Chao MC, Abel S, Davis BM, Baranowski C, Zhang YJ, et al. ARTIST: High-resolution genome-wide assessment of fitness using transposon-insertion sequencing. PLoS Genet. 2014;10(11):e1004782.
186. DeJesus MA, Ambadipudi C, Baker R, Sasseti C, Ioerger TR. TRANSIT - A Software tool for Himar1 TnSeq analysis. PLoS Comput Biol. 2015;11(10):e1004401.
187. Burger BT, Imam S, Scarborough MJ, Noguera DR, Donohue TJ. Combining genome-scale experimental and computational methods to identify essential genes in *Rhodobacter sphaeroides*. mSystems. 2017;2(3):e00015-17.
188. Primerano DA, Burns RO. Metabolic basis for the isoleucine, pantothenate or methionine requirement of ilvG strains of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 1982;150(3):1202-11.
189. Jackowski S, Alix JH. Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1990;172(7):3842-8.

190. Sandoval CM, Ayson M, Moss N, Lieu B, Jackson P, Gaucher SP, et al. Use of pantothenate as a metabolic switch increases the genetic stability of farnesene producing *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 2014;25:215-26.
191. Verschueren KHG, Blanchet C, Felix J, Dansercoer A, Vos DD, Bloch Y, et al. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature.* 2019;568(7753):571-5.
192. Cabruja M, Lyonnet BB, Millán G, Gramajo H, Gago G. Analysis of coenzyme A activated compounds in actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(16):7239-48.
193. Howieson VM, Zeng J, Kloehn J, Spry C, Marchetti C, Lunghi M, et al. Pantothenate biosynthesis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites is not a drug target. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist.* 2023;22:1-8.

SERMENT DOCTORAL
D'INTÉGRITÉ
SCIENTIFIQUE

« En présence de mes pairs.

Parvenue à l'issue de mon doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »

Gènes essentiels et voies métaboliques de *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant à l'origine de la pathogénicité vis-à-vis de l'épithélium des voies respiratoires humaines

Selon l'Organisation mondiale de la santé, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) résistant aux carbapénèmes est une cible prioritaire pour la production de nouveaux antibiotiques. Ainsi, comprendre les mécanismes sous-jacents de l'infection de ces bactéries résistantes permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La perte de la porine OprD, principal déterminant de la résistance aux carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours, est décrite comme améliorant le fitness in vivo et la virulence bactérienne. Le séquençage à transposons à haut débit permet d'identifier des gènes essentiels (GE) pouvant s'avérer être des cibles thérapeutiques. Cette stratégie n'a pas encore été utilisée pour PA OprD mutant.

Dans cette étude, nous avons identifié les GE spécifiques de PA14 OprD mutant pour la croissance en milieu LB, mis en évidence le gène *panC* codant la pantothénate synthétase comme cible thérapeutique prometteuse, et établi une liste de 30 GE de PA14 OprD mutant. Par CRISPRi, nous avons confirmé que l'inactivation de *panC* réduisait la croissance en LB, l'expression de *sigX*, dont la surexpression est associée à la fluidité membranaire, et l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (SAG). En considérant la « faiblesse » de PA14 OprD mutant due à une altération de la membrane consécutive à une diminution de SAG insaturés en l'absence de *panC*, nous avons montré que l'inactivation de *panC* augmentait le temps d'obtention de la mort des cellules bronchiques 16HBE. Ceci met en évidence le potentiel d'anti-virulence de l'inhibition de *panC* et sa pertinence en tant que cible pour le traitement des infections pulmonaires au PA OprD mutant résistant aux carbapénèmes.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Épithélium des voies aériennes, Infection, Résistance aux antibiotiques, OprD

Essential genes and metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* OprD mutant causing pathogenicity on the epithelium of the human respiratory tract

For the World Health Organization, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is a critical priority for which new antimicrobial drugs are needed. Consequently, understanding the underlying mechanisms of resistant bacteria infection will enable the identification of new therapeutic targets. Loss of the OprD porin is the main determinant of resistance to the last resort carbapenem antibiotics and has been described to enhance fitness in vivo and virulence. Transposon sequencing is a high-throughput sequencing technique that makes it possible to identify essential genes (EGs) that may turn out to be therapeutic targets. However, such a strategy has not yet been used for OprD-deficient *P. aeruginosa*.

In this study, we identified the EGs specific to PA14 OprD mutant for LB growth and we established a list of 30 EGs among these, we highlighted the *panC* gene encoding pantothenate synthetase as a promising target. Using CRISPRi, we confirmed that silencing *panC* reduced LB growth, and decreased *sigX* expression, whose overexpression is associated with membrane fluidity, as well as the expression of genes involved in the fatty acid synthesis (FAS). Taking into account the weakness of PA14 OprD mutant due to an altered membrane consecutive to a decrease in unsaturated FAS in the absence of *panC*, we showed that silencing *panC* extended the destruction time of 16HBE airway cells. Overall, our findings highlighted the anti-virulence potential of *panC* inhibition and shed new light on its inhibition as a target for treating carbapenem-resistant OprD-defective PA lung infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Airway epithelium, Infection, Antibiotic resistance, OprD

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

Unité Inserm UMR-S1250

Pathologie Pulmonaire et Plasticité Cellulaire (P3Cell)

45 rue Cognacq-Jay, CHU Maison-Blanche,
51092 Reims Cedex

