



**HAL**  
open science

# Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane

Hichem Chaker

► **To cite this version:**

Hichem Chaker. Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENS005 . tel-00682876

**HAL Id: tel-00682876**

**<https://theses.hal.science/tel-00682876>**

Submitted on 27 Mar 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement.

Arrêté ministériel : 7 août 2006.

Présentée par

**Hichem CHAKER**

Thèse dirigée par : M. le Professeur Bertrand Toussaint

Préparée au sein du Laboratoire « Thérapeutique Recombinante Expérimentale (TheREx) », TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525.

École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE).

## Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane.

Thèse soutenue publiquement le 07 mars 2012, devant le jury composé de :

<b>M. le Professeur Benoît POLACK</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	<b>Président</b>
<b>Mme. le Professeur Karine Vallée-Réhel</b> Université de Bretagne-Sud, Lorient	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. le Professeur Sylvie Laurency</b> Université de Rouen, Rouen	<b>Rapporteur</b>
<b>M. le Professeur Max Maurin</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	<b>Examineur</b>
<b>Mme. le Docteur Anne Doleans-Jordheim</b> Université Lyon 1, Lyon	<b>Examineur</b>
<b>M. le Professeur Bertrand Toussaint</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	<b>Directeur de thèse</b>



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et  
Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement.

Arrêté ministériel : 7 août 2006.

Présentée par

**Hichem CHAKER**

Thèse dirigée par : M. le Professeur Bertrand Toussaint

Préparée au sein du Laboratoire « Thérapeutique Recombinante  
Expérimentale (TheREx) » TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525.

École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et  
l'Environnement (EDISCE).

## Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane.

Thèse soutenue publiquement le 07 mars 2012, devant le jury  
composé de :

<b>M. le Professeur Benoît POLACK</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	Président
<b>Mme. le Professeur Karine Vallée-Réhel</b> Université de Bretagne-Sud, Lorient	Rapporteur
<b>Mme. le Professeur Sylvie Laurency</b> Université de Rouen, Rouen	Rapporteur
<b>M. le Professeur Max Maurin</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	Examineur
<b>Mme. le Docteur Anne Doleans-Jordheim</b> Université Lyon 1, Lyon	Examineur
<b>M. le Professeur Bertrand Toussaint</b> Université Joseph Fourier, Grenoble	Directeur de thèse



---

*À la mémoire de mon frère Rachid*

*(Mort en 2009 en allant sauver des vies)*

---

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur **Benoît POLACK**, qui m'a accueilli dans le Laboratoire ThERex et qui me fait l'honneur d'être Président du jury. Je souhaite remercier l'association « **Vaincre la Mucoviscidose** » qui m'a soutenu financièrement.

*Il est difficile en quelques mots d'exprimer ma profonde gratitude pour tout ce que je dois à Monsieur le Professeur **Bertrand TOUSSAINT** qui m'a guidé au cours de cette thèse et pour l'ensemble du savoir pratique et théorique qu'il m'a transmis. Sa patience, sa disponibilité, sa gentillesse inestimable, ses qualités humaines, sa confiance, et la qualité de son encadrement scientifique ont permis que cette thèse se passe dans de bonnes conditions.*

Je souhaite remercier très vivement Madame le Professeur **Karine Vallée-Réhel** du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de Lorient et Madame le Professeur **Sylvie Laurency** du Laboratoire de Microbiologie du Froid-Signaux et Micro-environnement d'Evreux. Elles ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit; je leur suis reconnaissant du privilège qu'ils me font en jugeant ce travail.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur **Max Maurin** (Institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble) et Madame le Docteur **Anne Doleans-Jordheim** (Laboratoire de Mycologie-Microbiologie de l'Université Lyon 1) qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail, nous permettant ainsi de disposer de leurs expertises dans de nombreux domaines de cette thèse.

La plupart des résultats présentés dans ce mémoire n'auraient pas pu être obtenus en dehors des collaborations développées avec différentes équipes; je tiens donc à remercier Madame le Professeur **Karine Vallée-Réhel** et Monsieur le Professeur **Benoît Guery** ainsi que leurs équipes pour toutes les expérimentations que nous avons pu conduire, Monsieur le Professeur **Aziz Bakri, Nawel Khalef** et leur équipe (Laboratoire de Formulation et Procédés Pharmaceutiques de Grenoble), Monsieur le Professeur **Ahcene Boumendjel** et son équipe (Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Joseph Fourier, Grenoble) ainsi que Monsieur le Docteur **Mohamed Habib** (Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), EMBL, Grenoble) qui m'a initié à la production des anticorps.

Pour leurs conseils, leur soutien et les moments que nous avons partagés, j'adresse un grand merci à **Madiha, Lavinia, Bruno, Roberta, Sandra, Marie-Claire, Xavier, Raphaël, Audrey** et tous les autres membres du Laboratoire qui m'ont aidé à réaliser ce travail. Eh bien oui!! Il ne faut pas oublier « Madame le Professeur **Yan Wang** », Un big merci pour toi Yan.

Et surtout, je voudrais adresser plus qu'un grand merci à mes **parents** qui ont toujours été là pour moi et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je remercie toute ma grande famille et particulièrement ma perle **Afaf** pour sa patience et son courage. Un grand merci à **Ferhat** et sa famille ainsi que mes frères en Allemagne, **Nasreddine** et **Salim**. En fin, il est difficile d'exprimer tout ce que je dois à mon frère, mon père, mon ami **Rachid** et sa famille. Il m'a soutenu moralement et financièrement jusqu'à sa mort. J'aurai bien aimé qu'il soit présent le jour de ma soutenance mais...

---

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AHL	acylhomosérine lactone
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCP	milieu Bromo-Cresol Purple agar
BET	bromure d'éthidium
BSA	bovin sérum albumine
Da	dalton
DMEM	milieu dulbecco modified eagle medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	mélange des désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
DO <sub>600</sub>	densité optique à 600 nm
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EGTA	éthylène glycol-bis-(β-aminoethyl éther)-N,N,N',N' tétraacétate
GFP	green fluorescent protein
GTP	guanosine triphosphate
IFN	interféron
Ig	immunoglobulines
IL	interleukine
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	milieu de Luria & Bertani
MOI	multiplicity of infection : nombre de bactérie(s) par cellule eucaryote
Pb	paires de bases

---

PBS	Tampon phosphate isotonique "Phosphate Buffer Saline"
PCA	acide perchlorique
PCR	polymerase chain reaction
PIA	Pseudomonas isolation agar
p/v	poids pour volume
QS	quorum sensing
qsp	quantité suffisante pour
RLU	unité de luminescence relative « relative luciférase units »
rpm	rotations par minute
RPMI	milieu modifié de Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDSPAGE	SDS- <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SSI	sérum salé isotonique
SSTT	système de sécrétion de type III
SVF	sérum de veau fœtal
TAE	tampon Tris acétate EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TLR	<i>toll-like receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
U	unité enzymatique
UV	ultraviolets
VB	milieu de Vogel & Bonner
v/v	volume pour volume
X <sup>r</sup>	résistance à l'antibiotique X

---

---



---

**Table des matières**

**Principales Abréviations**

**Liste des Tableaux et des Figures**

<b>Partie 1 : Introduction</b>	1
<b>Chapitre 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	3
1. Taxonomie	3
2. Caractéristiques	3
3. Génome	4
4. Habitat et distribution environnementale	6
5. Résistance aux antibiotiques	6
6. Les infections à <i>P. aeruginosa</i>	8
6. 1. <i>P. aeruginosa</i> et la mucoviscidose	11
7. Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	13
7. 1. Les facteurs de virulence secrétés	14
7. 1. 1. L'exotoxine A	14
7. 1. 2. Les phospholipases	15
7. 1. 3. Les protéases	16
7. 1. 3. 1. Les métalloprotéases	16
7. 1. 3. 1. 1. L'élastase Las B (Pseudolysine)	16
7. 1. 3. 1. 2. L'élastase Las A (Staphylolysine)	17
7. 1. 3. 1. 3. La protéase alcaline (Aeruginolysine)	17
7. 1. 3. 2. Les sérine-protéases	17
7. 1. 3. 2. 1. La protéase IV (Arginyl peptidase)	17
7. 1. 3. 2. 2. Las D	17
7. 1. 4. La leucocidine	18
7. 1. 5. Les phénazines	18
7. 1. 6. Les pyoverdines	19
7. 1. 5. Les rhamnolipides	19
7. 1. 6. Les lectines	20
7. 2. Les facteurs de virulence associés à la bactérie	21
7. 2. 1. Les pili	21
7. 2. 2. Le flagelle	22
7. 2. 3. Le biofilm	24
7. 2. 4. Le lipopolysaccharide (LPS)	26
7. 2. 5. La protéine OprF	27
7. 2. 6. L'alginate	29
7. 3. Les systèmes de sécrétion	30
7. 3. 1. Les systèmes de sécrétion Sec dépendant	30
7. 3. 1. 1. Le système de sécrétion de type II	32
7. 3. 1. 2. Le système de sécrétion de type V	33

---



7. 3. 1. 3. Le système de sécrétion chaperone/usher	35
7. 3. 2. Les systèmes de sécrétion Sec indépendants	36
7. 3. 2. 1. Le système de sécrétion de type I	36
7. 3. 2. 2. Le système de sécrétion de type IV	37
7. 3. 2. 3. Le système de sécrétion de type VI	37
7. 3. 2. 4. Le système de sécrétion de type III	38
<b>Chapitre 2 : Le système de sécrétion de type III de <i>P. aeruginosa</i></b>	41
<b>1. L'organisation génétique</b>	41
<b>2. Les deux parties du SSTT</b>	41
2. 1. L'injectisome	41
2. 1. 1. Le corps basal	42
2. 1. 2. L'aiguille de sécrétion	43
2. 2. Le translocon	45
<b>3. Les effecteurs du SSTT</b>	46
3. 1. Les exotoxines ExoS et ExoT	48
3. 2. L'exotoxine ExoY	49
3. 3. L'exotoxine ExoU	50
<b>4. Les chaperonnes du SSTT</b>	51
<b>5. Les signaux de sécrétion de type trois</b>	51
5. 1. Une séquence de la partie 5' de l'ARNm	51
5. 2. Une séquence peptidique de la partie N-terminale	52
5. 3. Le signal chaperonne	53
<b>Chapitre 3 : Régulation du système de sécrétion de type trois</b>	55
<b>1. Aspects communs de la régulation chez les bactéries pathogènes</b>	55
1. 1. Régulation liée à l'hôte et l'environnement	56
1. 1. 1. La température	56
1. 1. 2. Les cations divalents	57
1. 1. 3. Le contact Cellulaire	57
1. 1. 4. Le sérum	58
1. 1. 5. Autres facteurs	58
<b>2. Les signaux métaboliques et de stress</b>	59
<b>3. Le quorum sensing</b>	59
<b>4. Le contact cellulaire et le couplage sécrétion/activation : les régulateurs secrétés</b>	60
<b>5. Les activateurs transcriptionnels de type AraC</b>	61
<b>6. Les chaperonnes</b>	63
<b>7. Les systèmes à deux composants</b>	63
<b>8. Les composants de l'appareil de sécrétion</b>	64
<b>L'injectisome</b>	
<b>9. Régulation du SSTT de <i>P. aeruginosa</i></b>	65
9. 1. Le couplage sécrétion/activation ExsA dépendent	66
9. 1. 1. ExsA est le régulateur clef du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	66
9. 1. 2 La régulation par ExsA	67
9. 2. La régulation ExsA indépendante	70
9. 2. 1. La régulation épigénétique: bistabilité du SSTT	70
9. 2. 2. Régulation liée à l'hôte et l'environnement : les systèmes à deux composants et les petits ARNs	71

---

9. 2. 3. Effets du métabolisme et du stress	74
9. 2. 3. 1. La voie de régulation de l'AMPc et Vfr	74
9. 2. 3. 2. L'acetyl-CoA et autres stimuli énergétiques	76
9. 2. 3. 3. L'anaérobiose	76
9. 2. 3. 4. Les acides gras à chaînes longues	76
9. 2. 3. 5. Les acides aminés	77
9. 2. 3. 6. Autres signaux métaboliques ou du stress	77
9. 2. 4. La communication interbactérienne : le Quorum Sensing	79
9. 2. 5. L'immunité de l'hôte	81
9. 2. 6. L'adaptation à long terme	81
<b>10. Objectifs du travail</b>	<b>84</b>
<b>Partie 2 : Matériel et méthodes</b>	<b>85</b>
<b>1. Souches, plasmides et oligonucleotides</b>	<b>87</b>
1. 1. Souches	87
1. 2. Plasmides	89
1. 3. Oligonucleotides	90
<b>2. Culture bactérienne</b>	<b>91</b>
2. 1. Milieux de culture	91
2. 2. Antibiotiques utilisés	92
2. 3. Culture de <i>P. aeruginosa</i>	92
2. 4. Culture d' <i>Escherichia coli</i>	93
2. 5. Suivi de la croissance et densité bactérienne	93
2. 6. Conservation des souches	93
<b>3. Techniques de biologie moléculaire</b>	<b>93</b>
3. 1. Polymérisation en chaîne (PCR)	93
3. 2. Electrophorèse d'ADN	95
3. 3. Extraction des fragments d'ADN	95
3. 4. Digestion enzymatique	95
3. 5. Clonage	95
3. 5. 1. Sous clonage	96
3. 5. 2. Déphosphorylation	96
3. 5. 3. Ligation	96
3. 5. 4. Génération d'extrémités à bout franc par le fragment de Klenow	96
3. 6. Transformation	97
3. 6. 1. Transformation d' <i>E. coli</i>	97
3. 6. 2. Transformation de <i>P. aeruginosa</i> par électroporation	97
3. 7. Préparation d'ADN chromosomique de <i>P. aeruginosa</i>	97
3. 8. Préparation d'ADN plasmidique	98
3. 9. Dosage des acides nucléiques	98
3. 10. Mutagenèse par échange allélique chez <i>P. aeruginosa</i>	99
3. 10. 1. Echange allélique	99
3. 10. 2. Conjugaison biparentale	99
3. 10. 3. Sélection des clones double recombinant	100
3. 10. 4. Excision de la cassette de résistance	100
3. 11. Souches de <i>P. aeruginosa</i> contenant une fusion transcriptionnelle rapportrice dans le chromosome	102

---

3. 12. Complémentation des mutants	103
<b>4. Techniques de biochimie</b>	103
4. 1. Activation du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	103
4. 2. Mesure de l'activation transcriptionnelle des gènes du SSTT par luminescence	104
4. 3. Les protéines secrétées par le SSTT	104
4. 3. 1. Précipitation au PCA	104
4. 3. 2. Dénaturation	104
4. 3. 3. Electrophorèse SDS-PAGE	105
4. 4. Analyse des protéines	106
4. 4. 1. Coloration au bleu de Coomassie	106
4. 4. 2. Western blot	106
4. 4. 2. 1. Transfert semi-sec	106
4. 4. 2. 2. Immuno-détection	107
4. 5. Recherche d'inhibiteur (s) du SSTT dans le surnageant d'une culture en phase stationnaire de <i>P. aeruginosa</i>	107
4. 5. 1. Préparation du surnageant	107
4. 5. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice du surnageant	107
4. 5. 3. Précipitation et extraction	108
4. 5. 4. Analyses par chromatographie en phase liquide à Haute Performance (CLHP)	108
4. 5. 4. 1. Fractionnement par CLHP semi-préparative	108
4. 5. 4. 2. Analyse par ESI-LC/MS	109
4. 6. Dosage des kynurénines	109
4. 7. Dosage des anticorps par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	110
<b>5. Production des anticorps anti-OprF</b>	111
5. 1. Production	111
5. 2. Purification par précipitation et dialyse	111
5. 3. Purification et concentration sur colonne de protéine A	112
5. 4. L'isotypage	112
5. 5. Quantification	112
5. 6. Conservation	112
<b>6. Manipulation des cellules eucaryotes</b>	112
6. 1. Macrophages J774	112
6. 2. PLB-985	113
<b>7. Manipulation des animaux</b>	113
7. 1. Généralités	113
7. 2. Injection	114
<b>8. Statistiques</b>	114
<b>Partie 3 : Résultats</b>	115
<b>Chapitre 1 : autorépression du système de sécrétion de type 3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	117
<b>1. Le mode d'action du PARST</b>	118
<b>2. La caractérisation du PARST</b>	123
2. 1. La production du PARST dépend du L-tryptophane	124
2. 2. Approche génétique : la/les voies impliquées dans la production du PARST	125
2. 2. 2. La voie des kynurénines est partiellement impliquée dans la production du PARST	127

2. 2. 3. La production du PARST ne dépend pas de la voie du PQS	129
2. 2. 4. La délétion de l'opéron <i>phnAB</i> n'a pas d'effet sur la production du PARST	131
2. 2. 5. L'anthranilate et la production du PARST	132
2. 2. 6. La voie des phénazines est probablement impliquée dans la production du PARST	134
2. 3. Approche chimique	136
2. 3. 1. Validation du protocole de caractérisation du signal PARST	136
2. 3. 2. Fractionnement du surnageant	138
2. 3. 3. Tentative d'identification de la/les molécules PARST	141
2. 3. 3. 1. Analyse à 280 nm	142
2. 2. 3. 1. Analyse à 254 nm	145
<b>3. Discussion</b>	148
<b>Chapitre 2 : kynurénines et virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	153
<b>1. Production des kynurénines par <i>P. aeruginosa</i></b>	155
1. 1. Fiabilité du test d'Ehrlich Kovacs	155
1. 2. Le tryptophane est indispensable pour produire des kynurénines	157
1. 3. Complémentation	160
1. 4. Cinétique de production de kynurénine par <i>P. aeruginosa</i>	162
<b>2. Activité d'expression du gène <i>kynA</i></b>	164
2. 1. Cinétique d'expression du gène <i>kynA</i>	165
2. 2. La kynurénine et le tryptophane induisent l'expression du gène <i>kynA</i>	165
2. 3. Expression du gène <i>kynA</i> au cours de l'interaction hôte/pathogène	167
<b>3. Les kynurénines sont impliquées dans la virulence de <i>P. aeruginosa</i></b>	169
3. 1. Survie des souris après l'infection	170
3. 2. Évolution du poids des souris après l'infection	171
3. 3. Perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire	173
3. 4. Quantification de la charge bactérienne pulmonaire	176
3. 5. Les kynurénines et la virulence de la souche PAO1	177
<b>4. Les kynurénines et la réponse immunitaire</b>	181
4. 1. L'IFN- $\gamma$ stimule la production des kynurénines <i>in vitro</i>	181
4. 2. Les kynurénines et la réponse immunitaire humorale	183
<b>5. Discussion</b>	186
<b>Chapitre 3 : La protéine OprF et la virulence de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i></b>	191
<b>1. La protéine OprF est impliquée dans l'expression du SSTT</b>	191
<b>2. Production d'un anticorps anti-OprF</b>	194
<b>3. Discussion</b>	196
<b>Partie 4 : Conclusion et Perspectives</b>	199
<b>Références Bibliographiques</b>	209
<b>Annexes</b>	263



### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	3
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques générales du génome de certaines souches de <i>P. aeruginosa</i>	5
<b>Tableau 3</b> : Les principaux aspects communs de la régulation des SSTTs de différents pathogènes des animaux	56
<b>Tableau 4</b> : liste des souches utilisées dans cette étude	87-88
<b>Tableau 5</b> : liste des plasmides utilisés dans cette étude	89
<b>Tableau 6</b> : liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude	90
<b>Tableau 7</b> : Antibiotiques utilisés	92
<b>Tableau 8</b> : Solutions pour la partie supérieure du gel SDS-PAGE	105
<b>Tableau 9</b> : Solutions pour la partie inférieure du gel SDS-PAGE	106
<b>Tableau 10</b> : Dosage de la phénazine-1-carboxylate	145
<b>Tableau 11</b> : Les masses majoritaires détectées dans les sous fractions de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA	147

### Liste des figures

<b>Figure 1</b> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<b>Figure 2</b> : Les infections à <i>P. aeruginosa</i>	9
<b>Figure 3</b> : La transition de <i>P. aeruginosa</i> entre une infection aiguë et chronique	10
<b>Figure 4</b> : Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	14
<b>Figure 5</b> : Structure du Pilus de type IV de <i>P. aeruginosa</i>	22
<b>Figure 6</b> : Structure et assemblage du flagelle bactérien	23
<b>Figure 7</b> : Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<b>Figure 8</b> : Structure du lipopolysaccharide (LPS)	27
<b>Figure 9</b> : Modèle d'activation du quorum sensing par l'IFN- $\gamma$	28

---

---

<b>Figure 10</b> : Présentation schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines connus chez les bactéries à Gram négatif	31
<b>Figure 11</b> : Structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif	40
<b>Figure 12</b> : Organisation génétique du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	42
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique du SSTT de <i>Yersinia enterocolitica</i> et les protéines homologues chez <i>P. aeruginosa</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella enterica</i> et <i>E. Coli</i>	44
<b>Figure 14</b> : Activité des toxines du SSTT	47
<b>Figure 15</b> : Les domaines fonctionnels des exotoxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY	48
<b>Figure 16</b> : Modèle d'induction <i>in vitro</i> du SSTT	68
<b>Figure 17</b> : Régulation de l'expression du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	83
<b>Figure 18</b> : Procédure d'inactivation des gènes par le système <i>cre-lox</i>	101
<b>Figure 19</b> : Construction des fusions transcriptionnelles rapportrices	102
<b>Figure 20</b> : Autorépression du SSTT	118
<b>Figure 21</b> : Le plasmide <i>pexsAind</i>	119
<b>Figure 22</b> : Le PARST agit au niveau post-transcriptionnel	121
<b>Figure 23</b> : Voies régulant les facteurs de virulence au cours d'une transition entre infection aiguë et infection chronique	122
<b>Figure 24</b> : Le L-tryptophane et non le D-tryptophane est impliqué dans la production du PARST	124
<b>Figure 25</b> : Métabolisme du tryptophane chez <i>Pseudomonas spp.</i>	126
<b>Figure 26</b> : La production du PARST ne dépend pas que de la voie des kynurénines	128
<b>Figure 27</b> : La production du PARST ne dépend pas de la voie du PQS	130
<b>Figure 28</b> : L'opéron <i>phnAB</i> n'est pas impliqué dans la production du PARST	131
<b>Figure 29</b> : L'anthranilate n'inhibe pas l'expression du SSTT	132
<b>Figure 30</b> : Voie de biosynthèse du tryptophane chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1	133
<b>Figure 31</b> : La voie des phénazines est probablement impliquée dans la production du PARST	134
<b>Figure 32</b> : Protocole de caractérisation du signal PARST	137
<b>Figure 33</b> : Les différents traitements de purification n'affectent pas la stabilité du PARST	138

---

---

<b>Figure 34</b> : Chromatographes à 280 nm de deux surnageants actif et non actif	139
<b>Figure 35</b> : Activité d'autorépression des différentes fractions issu du surnageant actif	140
<b>Figure 36</b> : Activité d'autorépression des sous fractions de la fraction 3	141
<b>Figure 37</b> : Masses majoritaires détectées dans la fraction 3	142
<b>Figure 38</b> : Spectre de masse de la phénazine-1-carboxylate	143
<b>Figure 39</b> : Évaluation de l'activité PARST de la phénazine-1-carboxylate	144
<b>Figure 40</b> : Les masses majoritaires détectées dans la fraction 3 issue du surnageant de la souche CHA	146
<b>Figure 41</b> : Voie des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i>	154
<b>Figure 42</b> : Le réactif d'Ehrlich Kovacs interagit essentiellement avec la L-kynurénine	156
<b>Figure 43</b> : Dosage de la kynurénine accumulée dans les surnageants des souches CHA, CHAΔ <i>KynA</i> et CHAΔ <i>kynU</i>	157
<b>Figure 44</b> : Le tryptophane est indispensable pour la production de kynurénine par <i>P. aeruginosa</i>	158
<b>Figure 45</b> : Dosage de la kynurénine produite par différents mutants de <i>P. aeruginosa</i>	159
<b>Figure 46</b> : Production de la kynurénine par des mutants de <i>P. aeruginosa</i> complémentés	161
<b>Figure 47</b> : La tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) est essentielle pour la production des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i>	163
<b>Figure 48</b> : Cinétique d'expression du gène <i>kynA</i>	165
<b>Figure 49</b> : La transcription du gène <i>kynA</i> est augmentée en présence de la L-kynurénine et le L-tryptophane	166
<b>Figure 50</b> : La voie des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i> est stimulée au cours de l'interaction hôte/pathogène	167
<b>Figure 51</b> : Cinétique d'expression du gène <i>kynU</i>	169
<b>Figure 52</b> : Survie des souris instillées avec la souche CHA, CHAΔ <i>kynA</i> ou CHAΔ <i>kynU</i>	171
<b>Figure 53</b> : Poids des souris instillées par la souche CHA, CHAΔ <i>kynA</i> ou CHAΔ <i>kynU</i>	172
<b>Figure 54</b> : Une alvéole intacte dans l'état normal et une alvéole malade dans le cas d'une pneumonie aigüe	174

---



<b>Figure 55</b> : Perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire après instillation intratrachéale de trois souches de <i>P. aeruginosa</i>	175
<b>Figure 56</b> : Charge bactérienne dans les poumons	176
<b>Figure 57</b> : Production de la kynurénine par la souche PAO1 et le mutant POA1Δ <i>kynA</i>	177
<b>Figure 58</b> : Effet des kynurénines sur la virulence de la souche PAO1	178
<b>Figure 59</b> : La translocation bactérienne	180
<b>Figure 60</b> : L'IFN-γ stimule la voie des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i>	182
<b>Figure 61</b> : Anticorps produits après infection par les souches CHA, CHAΔ <i>kynA</i> ou CHAΔ <i>kynU</i>	185
<b>Figure 62</b> : La mutation Δ <i>oprF</i> réduit la sécrétion de type trois	192
<b>Figure 63</b> : La surexpression d' <i>exsA</i> restaure l'activité du SSTT en absence de la protéine OprF	193
<b>Figure 64</b> : En absence d'OprF, ExoS-GP100 n'est pas séquestrée dans le cytoplasme	194
<b>Figure 65</b> : Les exotoxines ExoS/ExoT ne sont pas accumulées dans le cytoplasme du mutant Δ <i>oprF</i>	194
<b>Figure 66</b> : SDS-PAGE des anticorps anti-OprF	195
<b>Figure 67</b> : L'anticorps produit reconnaît la protéine OprF	196

---

*Partie 1 :*  
*Introduction*



## Chapitre 1 : *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus*. C'est en 1862 que Luke a mis en œuvre l'implication de *P. aeruginosa* dans des infections chez l'homme. Il a observé des particules de forme circulaire dans un pus de coloration bleu-vert. La même coloration a été observée par Sedillot. C'est le pigment pyocyanique (la pyocyanine) produit par *P. aeruginosa* qui est à l'origine de cette coloration. La pyocyanine est diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom du bacille pyocyanique.

### 1. Taxonomie

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille renferme dix genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*. *P. aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxinomie est présentée dans le tableau 1 :

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>aeruginosa</i>

**Tableau 1 : Taxonomie de *P. aeruginosa*.**

### 2. Caractéristiques

*P. aeruginosa* est connue depuis longtemps sous le nom de *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) ou agent du pus bleu des plaies surinfectées. Il s'agit d'un bacille à Gram

négatif non sporulant. Il mesure 1 à 5  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large (figure 1). *P. aeruginosa* est une bactérie motile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire.

Cette bactérie est mésophile. Elle est capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie et possède un métabolisme oxydatif. Elle utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons mais en absence de ce dernier, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Vasil, 1986).



**Figure 1:** *Pseudomonas aeruginosa* (www.pseudomonas.com)

### 3. Génome

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000. L'annotation des gènes est disponible sur le site internet [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com). Il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases codant 5570 cadres de lecture de la souche modèle PAO1 (Stover *et al.*, 2000).

Six autres souches ont été entièrement séquencées : PA14, PA7, LES, B58, C3719 et PA2192 (seules les trois premières souches sont complètement annotées) (Lee *et al.*, 2006; Mathee *et al.*, 2008; Winstanley *et al.*, 2009). La taille de ces génomes varie entre 5 et 7 méga bases.

Des études sur les génomes de plusieurs isolats cliniques et environnementaux de *P. aeruginosa* ont montré une forte conservation du contenu génomique. Particulièrement, les déterminants des facteurs de virulence sont fortement conservés (Wolfgang *et al.*, 2003a).

*P. aeruginosa* possède un nombre important de gènes impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques (tableau 2). Le taux des gènes impliqués dans la

<b>Souche</b>	<b>PA7</b>	<b>PAO1</b>	<b>PA14</b>	<b>LESB58</b>
<b>Taille du génome (Pb)</b>	6 588 339	6 264 404	6 537 648	6 601 757
<b>Contenu G+C</b>	66,5	66,6	66,3	66,3
<b>Les gènes codant des protéines</b>	6286	5566	5892	5925
<b>% des gènes codant</b>	89	89	89	88
<b>Les RNAs structurels</b>	75	77	72	81
<b>Les pseudogènes</b>	8	5	non	34
<b>Les fonctions</b>				
Traduction, structure et biogenèse des ribosomes	206	205	205	199
Transcription	530	516	537	501
Réplication, recombinaison et réparation de l'ADN	235	160	185	145
Division cellulaire et répartition des chromosomes	37	34	35	34
Modifications post-traductionnelles, renouvellement des protéines et des chaperonnes	215	200	210	201
Biogenèse de l'enveloppe cellulaire et de la membrane externe	260	265	266	261
Mobilité cellulaire et sécrétion	152	150	154	149
Transport et métabolisme des ions inorganiques	355	376	377	313
Mécanismes de transduction du signal	346	337	345	337
Production et conversion d'énergie	336	329	340	330
Métabolisme et transport des carbohydrates	250	252	249	196
Métabolisme et transport des acides aminés	571	587	590	490
Transport et métabolisme des nucléotides	105	108	110	104
Métabolisme des coenzymes	192	191	192	210
Métabolisme des lipides	245	244	248	234
Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires	198	205	212	171
Fonction prédite	759	756	771	603
Fonction inconnue	503	476	493	500

**Tableau 2 : Caractéristiques générales du génome de certaines souches de *P. aeruginosa*** (Roy *et al.*, 2010).

régulation (8,4%) est élevé par rapport aux autres bactéries; ces gènes représentent respectivement 5.8% et 5.3% des génomes d'*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Les autres gènes surreprésentés par rapport aux autres bactéries sont ceux codant pour les pompes d'efflux, les systèmes d'import de nutriments et les systèmes de chimiotactisme (Stover *et al.*, 2000).

Cette diversité lui confère une grande adaptabilité face à son environnement. *P. aeruginosa* est capable de métaboliser plus de 50 composés organiques et des composés inorganiques (Vasil, 1986). Elle peut donc se développer dans de nombreuses niches écologiques, même si elles sont pauvres en nutriments.

#### **4. Habitat et distribution environnementale**

*P. aeruginosa* est largement répandu dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire. Elle peut vivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques (Floret, 2009; Green *et al.*, 1974). Cette bactérie est également présente dans le tube digestif et sur la peau des mammifères. *P. aeruginosa* est très présente en milieu hospitalier et elle est responsable de nombreuses infections nosocomiales (11% des infections nosocomiales). Dans son environnement naturel, *P. aeruginosa* vit sous forme planctonique, mobile ou à l'état sessile dans un biofilm, attachée à une surface inerte ou une source de substrat.

#### **5. Résistance aux antibiotiques**

Employer des antibiothérapies répétitives contre *P. aeruginosa* a été à l'origine d'une augmentation des taux de mortalité chez les personnes infectées (Chung *et al.*, 2011; Cometta *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2002; Kollef *et al.*, 2008; Micek *et al.*, 2011; Rello and Diaz, 2003). Au cours des dernières décennies, il y avait dans le monde, une émergence rapide de souches multirésistantes de *P. aeruginosa*. Ces souches ont acquis une résistance à presque toutes les classes d'antibiotiques antipseudomonas disponibles, y compris celles à large spectre telles que les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones (Carmeli *et al.*, 1999; Fish *et al.*, 1995; Kollef *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 1986; Seok *et al.*, 2011; Vettoretti *et al.*, 2009).

Les infections causées par des souches multirésistantes représentent un problème majeur. Elles augmentent le risque d'échec thérapeutique (Maeda *et al.*, 2008; Sabuda *et al.*,

2008). Elles sont également à l'origine de bactériémies, d'une forte mortalité et des coûts de prise en charge des malades considérables (Giamarellou, 2002; Kollef *et al.*, 2008; Sostarich *et al.*, 2008).

*P. aeruginosa* a une remarquable capacité de développer une résistance à la plupart des agents antimicrobiens par de multiples mécanismes. Un de ses mécanismes de résistance est lié à sa capacité de changer de phénotype en mutant d'une souche invasive non mucoïde à une souche mucoïde surexprimant l'alginate, une matrice d'exopolysaccharide (voir la partie 7. 2. 6.) favorisant une colonisation pulmonaire chronique (Martin *et al.*, 1993). La mutation responsable de la forme mucoïde (*muc*) est associée à l'activation de la transcription du gène de l'alginate *algD*. La région responsable des formes mucoïdes et non mucoïdes contient trois gènes étroitement liés *algU*, *mucA*, et *mucB*. AlgU est un régulateur positif, *mucA* et *mucB* constituent le cluster de gènes contrôlant la conversion à la forme mucoïde. Une importante activation de la transcription d'*algD* et la conversion à la souche mucoïde sont observées quand *mucA* ou *mucB* sont inactivés au niveau du chromosome des souches initialement non mucoïdes. La production locale, par *P. aeruginosa*, d'exopolysaccharides (alginates) provoque la formation d'un biofilm enrobé d'une matrice d'exopolysaccharides (Costerton *et al.*, 1999).

Des mécanismes de résistance intrinsèque sont également à l'origine d'une résistance aux antibiotiques (Stover *et al.*, 2000). Ces mécanismes résultent d'une synergie entre une faible perméabilité de la membrane externe et la formation de pompes d'efflux spécifiques appelées Mex (multidrug efflux systems) incluant MexAB-OprM et MexXY-OprM. En plus de cette résistance intrinsèque, il existe trois autres systèmes MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexJK-OprM qui sont à l'origine d'une multirésistance acquise (Lister *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2008; Vettoretti *et al.*, 2009). Cette dernière résulte de mutations causant une hyperactivation des gènes qui codent pour les systèmes d'efflux (Barbier and Wolff, 2010; Maeda *et al.*, 2008; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). L'hyperexpression acquise des systèmes naturels d'efflux est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009). Les mutations activatrices portant sur l'opéron MexAB-oprM (expression constitutive faible) sont les plus fréquemment impliquées dans l'émergence des résistances aux  $\beta$ -lactamines.

En plus de ces mécanismes de résistance, la bactérie peut produire certaines enzymes inactivatrices comme dans le cas des aminosides (Bonomo *et al.*, 2006) ou muter les gènes



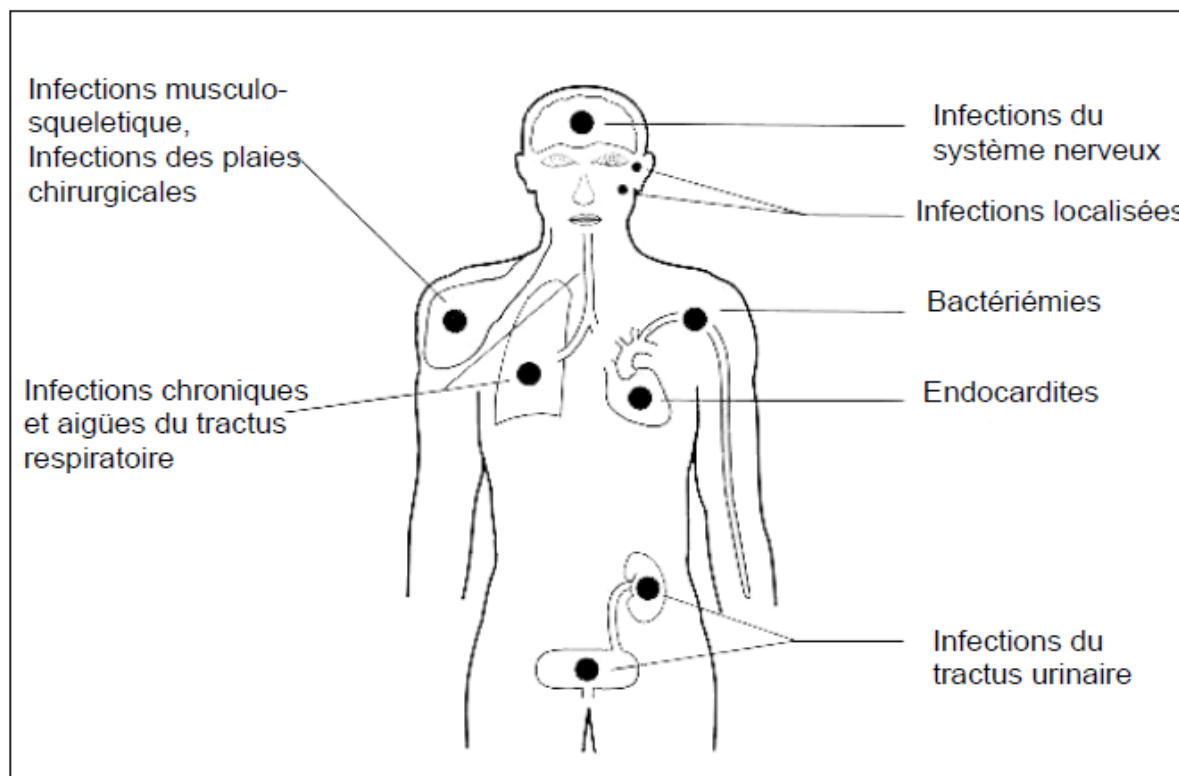
des topoisomérases II (*gyrA*) et IV (*parC*) (Lister *et al.*, 2009). Les souches multirésistantes peuvent cumuler plusieurs mécanismes de résistance par mutations et acquisitions de gènes (Dubois *et al.*, 2001; Lolans *et al.*, 2005).

## 6. Les infections à *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes : humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (D'Argenio *et al.*, 2001; Pukatzki *et al.*, 2002; Rahme *et al.*, 1995). Chez l'homme, elle n'adhère pas à l'épithélium normal intact et ne provoque de maladie que lorsqu'il existe une défaillance du système immunitaire ou une lésion préexistante. *P. aeruginosa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (Bielecki *et al.*, 2008; Branski *et al.*, 2009; Lyczak, 2000). Elle est capable de coloniser une grande diversité de tissus. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, urinaires, des dermatites, des otites externes, des kératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, des infections de la peau chez les grands brûlés, des endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses (figure 2), (Bielecki *et al.*, 2008; Bodey *et al.*, 1983; Branski *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Carek *et al.*, 2001).

Cette bactérie est impliquée dans des infections nosocomiales (Vitkauskienė *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2011). Elle cause plus de 4000 décès par an en France (Institut de Veille Sanitaire, 2007). Elle est en effet responsable de 16% des pneumonies nosocomiales, 12% des infections du tractus urinaire acquises à l'hôpital, 8% des infections liées aux interventions chirurgicales et 10% des infections du flux sanguin (Lyczak *et al.*, 2000; Van Delden and Iglewski, 1998; Vitkauskienė *et al.*, 2010).

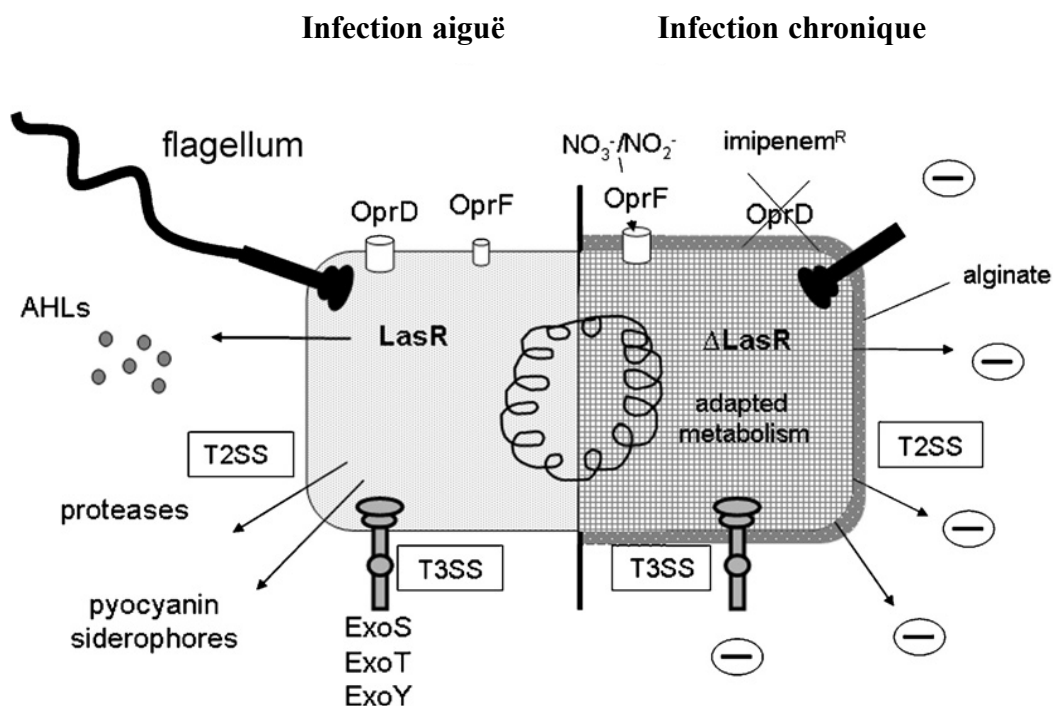
Suite aux signaux environnementaux, *P. aeruginosa* est capable de provoquer une infection aigüe ou chronique (figure 3). Chaque type d'infection est caractérisé par un certain nombre de facteurs de virulence exprimés par la bactérie (Hogardt and Heesemann, 2010; ventre *et al.*, 2006). Le type de l'infection dépend aussi de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte.



**Figure 2 : Les infections à *P. aeruginosa*** (<http://gsbs.utmb.edu>).

**L'infection aiguë :** *P. aeruginosa* est capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif, des voies urinaires et de la cornée (Berthelot *et al.*, 2005; Lyczak *et al.*, 2000). L'infection est caractérisée par sa rapidité et, elle est associée au mode de vie dit « planctonique » en opposition au mode de vie en biofilm. La bactérie est invasive et cytotoxique. Elle produit une grande quantité de facteurs de virulence tels que le LPS (voir la partie 7. 2. 4.), les adhésines, le flagelle, les protéases dont les élastases, les phospholipases et l'exotoxine A. Cette étape d'infection est caractérisée par un système de sécrétion de type trois fortement actif (Hogardt and Heesemann, 2010; Ventre *et al.*, 2006). La sécrétion des exotoxines est abondante (Allewelt *et al.*, 2000; Comolli *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005; Shaver and Hauser, 2004; Tang *et al.*, 1996).

La bactérie induit une forte réponse inflammatoire. Les protéases et les toxines sont à l'origine de dommages tissulaires conduisant à l'invasion de la circulation sanguine et par conséquent à des septicémies. En effet la bactérie est capable de faire des ouvertures au niveau des jonctions situées entre les cellules épithéliales (Coraux *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2005; Zulianello *et al.*, 2006).



**Figure 3 : La transition de *P. aeruginosa* entre une infection aigüe et chronique.** Ce processus est caractérisé par diverses adaptations comme la surproduction de l'alginate, la perte des facteurs cellulaires impliqués dans la virulence (la pyocyanine, les siderophores, le flagelle, et les molécules du quorum sensing (AHLs) à cause, par exemple, de l'inactivation de LasR), arrêt de la sécrétion de l'élastase et les effecteurs du système de sécrétion de type trois (T3SS), la perte d'OprD et la surexpression d'OprF impliquée dans la dénitrification (d'après Hogardt and Heesemann, 2010).

**L'infection chronique :** plusieurs définitions ont été proposées pour définir l'infection chronique (Ballmann *et al.*, 1998; Hoiby, 1977; Lee *et al.*, 2003; Proesmans *et al.*, 2006). En effet, elle peut être définie comme une infection qui persiste malgré les thérapies de lutte d'un côté, les défenses immunitaires et la réponse inflammatoire de l'hôte de l'autre côté. Comme dans le cas de la mucoviscidose, une infection chronique est caractérisée par la persistance de la pathologie et des réponses immunitaires (Pressler *et al.*, 2011).

La bactérie est non invasive et non cytotoxique. Elle produit moins de facteurs de virulence extracellulaires. En outre, la bactérie perd certains facteurs de virulence les plus immunogènes comme les pili et le flagelle (figure 3). Par conséquent, elle devient non mobile mais elle échappe à la clairance et aux réponses immunitaires de l'hôte. Elle surproduit des exopolysaccharides pour former un biofilm qui la protège également contre les mécanismes de défense de l'hôte (figure 3), (Hogardt and Heesemann, 2010; Singh *et al.*, 2000; Ventre *et*

*al.*, 2006). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'installation de la bactérie sous forme de biofilm est à l'origine d'épisodes d'exacerbations aiguës qui entretiennent un cercle vicieux pro-inflammatoire. L'élimination totale du pathogène des voies bronchiques devient impossible et l'infection évolue vers une détérioration progressive définitive des fonctions respiratoires (Aebi *et al.*, 1995; Pier, 2000; Pier, 2002).

### **6. 1. *P. aeruginosa* et la mucoviscidose**

La mucoviscidose est une maladie héréditaire autosomique récessive liée à la mutation d'un gène de 250 kb localisé sur le bras long du chromosome 7. Ce gène code pour une protéine membranaire composée de 1480 acides aminés, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Depuis 1989, date de l'identification du gène et de la principale mutation dite mutation delta F508 ( $\Delta F508$ ), plus de 1500 mutations ont été identifiées, parfois dans une seule famille (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr>). Cependant la trentaine de mutations couramment recherchées en routine couvre environ 85 à 90% des allèles mutés chez les patients. En France, environ la moitié des malades sont homozygotes pour la mutation delta F508 et les deux tiers ont une hétérozygotie composite incluant la mutation delta F508.

La protéine CFTR est une protéine membranaire ATP-dépendante située au pôle apical de l'ensemble des cellules épithéliales de l'organisme (voies aériennes, épithélium intestinal, pancréas exocrine, voies biliaires, tractus génital, glandes sudorales). Ses fonctions sont multiples et probablement incomplètement connues (Mehta, 2005). La plus importante est le rôle de régulation des échanges hydroélectrolytiques à travers la membrane épithéliale. CFTR est effectivement un canal chlore. Elle est également régulatrice d'autres canaux ioniques; suivant les mouvements de chlore et de sel, l'équilibre de ces échanges détermine le degré d'hydratation de la surface des épithélium (Reisin *et al.*, 1994; Schwiebert *et al.*, 1995). Les autres fonctions sont la régulation du pH des organelles intracellulaires, la stimulation de l'endocytose et de l'exocytose, la régulation de la sécrétion des glycoprotéines et des mucines, le transport de l'ATP et du glutathion, la régulation de la production de certaines cytokines pro et anti-inflammatoires (Mehta, 2005).

La mucoviscidose reste la plus fréquente des maladies génétiques mortelles dans les populations blanches. Elle touche environ 5500 malades en France. L'amélioration de la prise en charge de la maladie s'est accompagnée d'une augmentation très importante de l'espérance

de vie; celle-ci était de moins d'un an dans les années 1950 et dépasse 40 ans pour les enfants nés aujourd'hui (Dodge *et al.*, 2007; Elborn *et al.*, 1991; Observatoire National de la mucoviscidose, 2006)

Les patients atteints de mucoviscidose sont caractérisés par une insuffisance pancréatique, une obstruction des voies biliaires, une stérilité chez les mâles, une diminution de la fertilité chez les femelles, une sueur de haute concentration en ions Cl<sup>-</sup>, une obstruction intestinale, la formation de polypes nasaux, la sinusite chronique et un mucus des voies respiratoires épais et déshydraté (Collins, 1992). Ce mucus plus visqueux perturbe le phénomène de clairance ciliaire et constitue un terrain plus propice à la colonisation bactérienne (Lyczak *et al.*, 2002; Ratjen and Döring, 2003). La grande cause de morbidité et mortalité chez ces patients sont les infections pulmonaires (Boucher, 2004; Orenstein *et al.*, 2002). Ces infections détruisent progressivement le parenchyme pulmonaire et entraînent des complications supplémentaires telles que l'hypertension pulmonaire, des broncheectasies, et l'hypertrophie ventriculaire droite qui est à l'origine d'une insuffisance cardio-respiratoire et la mort (Boat *et al.*, 1989). Les jeunes patients sont souvent infectés par *P. aeruginosa*, *Haemophilus spp.* et *Staphylococcus aureus*. *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* peuvent également infecter les voies respiratoires de ces malades. Par la suite, *P. aeruginosa* devient le pathogène prédominant qui s'installe de façon chronique avant même l'âge de 10 ans des malades (Gilligan, 1991; Lyczak *et al.*, 2000; [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Les patients atteints de mucoviscidose développent une infection pulmonaire chronique conduisant à une destruction des tissus pulmonaires à cause des toxines bactériennes et le relargage du contenu des granules des cellules phagocytaires. Un modèle de pathogénicité suggère deux phases d'infection : l'invasion puis la persistance. Lors de l'invasion initiale du poumon, *P. aeruginosa* exprime une grande quantité de facteurs de virulence neutralisant les défenses immunitaires innées de l'hôte. Ensuite, durant la seconde phase, une fois la zone colonisée, la bactérie adhérerait à l'épithélium et adopterait un phénotype mucoïde. Elle se développe alors sous forme de micro-colonies entourées d'un biofilm. Sous cette forme, *P. aeruginosa* est plus résistante face aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques (Govan and Fyfe, 1978; Høiby *et al.*, 2010; Høiby *et al.*, 2011; Mulcahy *et al.*, 2008; Pamp *et al.*, 2008; Zhang and Mah, 2008). La colonisation de la totalité des poumons se ferait ensuite de proche en proche par ressortie d'individus du biofilm et réactivation du cycle d'invasion-persistance avec expression des facteurs de virulence.

En plus de son rôle comme canal ionique, la protéine CFTR peut influencer l'infection des poumons par *P. aeruginosa* via son rôle de récepteur pour ce microorganisme (Pier *et al.*, 1996). L'internalisation des bactéries par l'épithélium des voies respiratoires constitue un mécanisme de défense de l'hôte. Ce mécanisme sert à minimiser la charge bactérienne dans les voies respiratoires des poumons normaux. En cas d'atteinte de mucoviscidose, il est possible que la fonction d'internalisation soit détruite à cause de la mutation de la protéine CFTR. Ceci est à l'origine d'une charge bactérienne anormalement élevée, ce qui favorise l'installation d'une infection chronique.

L'importance d'accélérer la recherche de nouveaux actifs thérapeutiques contre *P. aeruginosa* ne fait que s'accroître avec la part prise par les infections pulmonaires dans la morbidité de la mucoviscidose et ce, d'autant plus que *P. aeruginosa* tend à devenir résistante à plusieurs antibiotiques (Perry *et al.*, 2008). À côté des thérapies consistant à diminuer la population bactérienne par des cures d'antibiotiques répétitives, les traitements en développement s'orientent vers deux axes. Ils tentent de perturber ou de détruire le biofilm pour éliminer les colonies déjà installées. En parallèle, ils visent à diminuer la cytotoxicité de la bactérie lors des phases aiguës de l'infection. Cette dernière approche passe par la répression de l'expression des gènes codant les différents facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* ou par l'inhibition de l'activité de ces facteurs.

Les traitements curatifs attendus visent à corriger l'anomalie génique ou moléculaire. De nombreux essais de thérapie génique ont été réalisés chez l'homme. Le but était de véhiculer le gène codant la protéine CFTR (gène non muté) jusqu'aux cellules épithéliales. Différents vecteurs ont été utilisés tel que les adénovirus et les liposomes. Cependant, des facteurs limitant conduisent à une perte d'efficacité rapide. Ceci exige une meilleure connaissance des barrières biologiques freinant le transfert génique et l'amélioration de l'efficacité des vecteurs (Alton, 2007; Balfour-Lynn, 2007).

## **7. Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa***

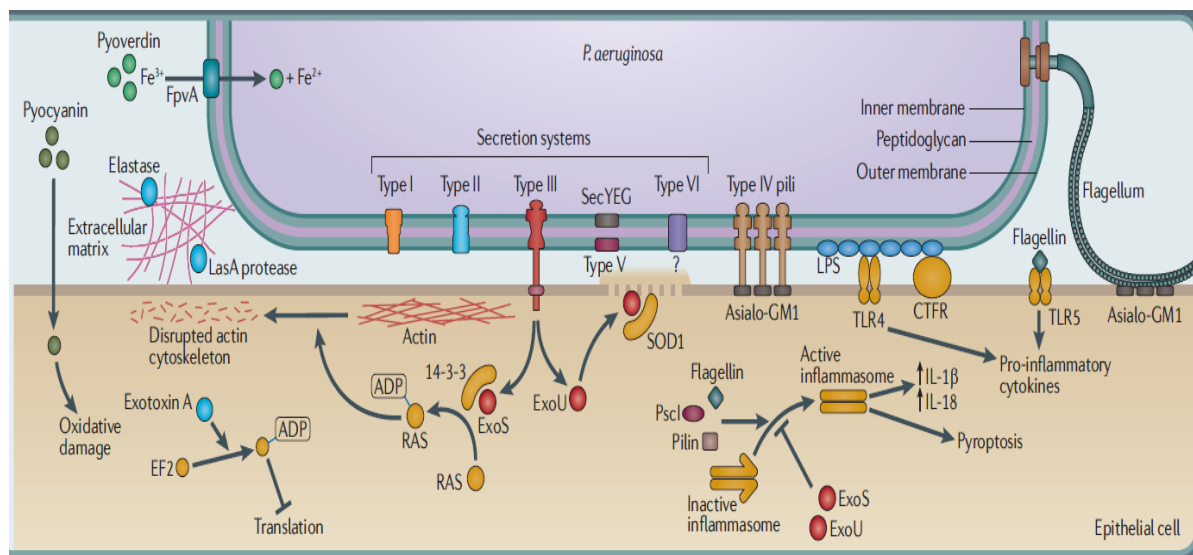
*P. aeruginosa* possède et utilise un vaste arsenal de facteurs de virulence (figure 4). Ces derniers lui permettant de s'adapter à différents environnements et coloniser divers types d'hôtes. Ces différents facteurs de virulence sont employés par la bactérie à des niveaux différents au cours du processus infectieux. Deux classes de ces facteurs peuvent être distinguées. La première correspond aux facteurs sécrétés comme les toxines et les protéases.

La deuxième classe est celle des facteurs associés à la membrane de la bactérie comme le flagelle et les pili et qui sont principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité. Les différents systèmes de sécrétions feront l'objet d'une partie séparée.

Les facteurs de virulence associés à la membrane sont généralement impliqués dans la phase de colonisation et l'infection chronique tandis que les facteurs extracellulaires, extrêmement toxiques, sont plutôt associés à l'infection aiguë.

### 7. 1. Les facteurs de virulence sécrétés

*P. aeruginosa* est capable de sécréter certains produits qui sont toxiques pour les cellules et les tissus de l'hôte. Ces facteurs de virulence peuvent agir à distance comme les hormones. Ils sont associés à l'infection aiguë et interviennent principalement dans la dissémination de la bactérie en perturbant les défenses de l'hôte.



**Figure 4 : Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.** Deux classes de facteurs de virulence : ceux associés à la bactérie, comme le flagelle et les pili, et ceux sécrétés, comme les toxines et les protéases (D'après Hauser and Ozer, 2011).

#### 7. 1. 1. L'exotoxine A

L'exotoxine A (ETA) est considérée comme la protéine la plus toxique sécrétée par *P. aeruginosa*. Il s'agit d'une enzyme de 66 kDa codée par le gène *toxA* et sécrétée dans l'espace extracellulaire sous forme d'une pro-toxine inactive via le système de sécrétion de type II (Gray *et al.*, 1984; Iglewski and Kabat, 1975). Elle est reconnue par les récepteurs CD91 et LRP (LDL related protein) (Herz *et al.*, 1990). Cette interaction provoque le clivage de la pro-

toxine et une internalisation de la partie active. Cette dernière, à activité ADP-ribosyl transférase, inhibe le facteur d'élongation-2 (EF-2) et, donc l'inhibition de la synthèse protéique induisant la mort cellulaire (Pavlovskis *et al.*, 1978; Perentesis *et al.*, 1992; Wick *et al.*, 1990).

L'exotoxine A inhibe la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 et l'IL-8. Ceci affaiblit la réponse immunitaire de l'hôte et aggrave l'état de l'infection (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001). L'exotoxine A est cruciale pour la virulence de *P. aeruginosa*. Des mutants déficients de l'exotoxine A ont été 20 fois moins virulents par rapport à la souche sauvage (Lory, 1986; Miyazaki *et al.*, 1995).

La production de l'exotoxine A dépend de la quantité du fer dans le milieu. Un maximum de production a été détecté dans un milieu pauvre en fer (Miyazaki *et al.*, 1995).

### 7. 1. 2. Les phospholipases

*P. aeruginosa* produit différentes phospholipases qui hydrolysent les liaisons phosphodiester des glycerophospholipides. Selon la spécificité de l'activité enzymatique, les phospholipases produites par *P. aeruginosa* sont de quatre types : la phospholipase A (PLA), B (PLB), C (PLC) et D (PLD). Différentes phospholipases sont secrétées dans le milieu extracellulaire :

- Trois PLCs : une à activité hémolytique (PlcH), PlcN non hémolytique (Ostroff *et al.*, 1990) et la PLcB (Barker *et al.*, 2004; Stonehouse *et al.*, 2002). Ces PLCs sont secrétées via le système de sécrétion de type II. Elles hydrolysent la phosphatidylcholine (PC) qui est très abondante dans le surfactant pulmonaire (Krieg *et al.*, 1988; Lazdunski *et al.*, 1990). De ce fait, les PLCs sont impliquées dans la virulence (Granstrom *et al.*, 1984). Une carence en phosphate ou la présence de certains osmoprotecteurs induit la production de PlcH (Sage and Vasil, 1997). La PlcB hydrolyse également la phosphatidylethanolamine (PE). Elle est importante pour le chimiotactisme et joue un rôle dans la mobilité de type « twitching » (Barker *et al.*, 2004).
- La PLD (PldA) : intervient dans la persistance de la bactérie au cours d'une infection pulmonaire chronique (Wilderman *et al.*, 2001a)
- La PLA cytosolique (cPLA2) : impliquée dans la mort des cellules de l'hôte (Kirschnek and Gulbins, 2006).



Les phospholipases sont importantes pour la virulence de la bactérie. Elles déstabilisent la membrane des cellules de l'hôte et sont à l'origine de la mort cellulaire (Vasil *et al.*, 2009). Leur activité permet également la libération de certains messagers lipidiques (Salyers and Witt, 1994). Elles déstabilisent les défenses de l'hôte en empêchant une réponse oxydative des neutrophiles (Terada *et al.*, 1999) et déclenchant la libération des molécules inflammatoires (Konig *et al.*, 1997).

L'activité des phospholipases est facilitée par les rhamnolipides (voir la partie 7. 1. 5.) produites par la bactérie. En effet, elles possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides membranaires facilitant leur accessibilité aux phospholipases (Boles *et al.*, 2005; Davey *et al.*, 2003). Les lécithinases sont également des hémolysines. Elles agissent en synergie avec les phospholipases pour hydrolyser les lipides et la lécithine.

### **7. 1. 3. Les protéases**

*P. aeruginosa* produit deux types de protéases : les métalloprotéases et les sérine-protéases. La production des protéases est régulée par le quorum-sensing (Gambello and Iglewski, 1991; Gambello *et al.*, 1993; Toder *et al.*, 1991).

#### **7. 1. 3. 1. Les métalloprotéases**

##### **7. 1. 3. 1. 1. L'élastase Las B (Pseudolysine)**

Il s'agit d'une métalloprotéase à zinc de 33 kDa, codée par le gène *lasB* et sécrétée par le système de sécrétion de type II (Bever and Iglewski, 1988; Kessler and Safrin, 1988; Morihara *et al.*, 1965). Cette protéase joue un rôle important dans la pathogénie de *P. aeruginosa*. En clivant l'élastine et le collagène, cette enzyme est à l'origine d'une destruction des jonctions entre les cellules épithéliales. Ceci augmente la perméabilité épithéliale et le recrutement des neutrophiles. Cette protéase fait augmenter la production de l'IL-8 et diminuer la réponse immunitaire innée en rendant inactifs, par clivage, des protéines du surfactant, SP-A et SP-D, et des récepteurs à protéases (Alcorn *et al.*, 2004; Azghani *et al.*, 1993; Azghani, 1996; Azghani *et al.*, 2000; Dulon *et al.*, 2005; Kon *et al.*, 1999). L'élastase B est également capable d'inactiver d'autres protéines comme les IgA, les IgG et des composés du complément modulant ainsi la réponse immunitaire (Heck *et al.*, 1990; Hong and Ghebrehiwet, 1992). Elle a la capacité de cliver la protéine uPAR2 (urokinase-type plasminogen activator receptor) qui est nécessaire à la migration et l'adhérence des cellules

épithéliales et des leukocytes (Beaufort *et al.*, 2004). Elle inhibe aussi la réparation des cellules épithéliales lésées en altérant la mobilité cellulaire (De Bentzmann *et al.*, 2000).

### **7. 1. 3. 1. 2. L'élastase Las A (Staphylolysine)**

C'est une protéase de 20 kDa, codée par le gène *lasA* et sécrétée par le système de sécrétion de type II (Olson and Ohman, 1992). Elle agit en synergie avec l'élastase B pour la dégradation de l'élastine (Kessler *et al.*, 1997). Elle représente un facteur de virulence important qui a la capacité de moduler les défenses de l'hôte (Estrellas *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

### **7. 1. 3. 1. 3. La protéase alcaline (Aeruginolysine)**

C'est une métalloprotéase à zinc de 56 kDa codée par le gène *aprA* (Okuda *et al.*, 1990). Elle représente la seule protéase sécrétée par le système de sécrétion de type I (ou transporteur ABC) (Guzzo *et al.*, 1991). Elle lyse la fibrine et inhibe sa formation (Kipnis *et al.*, 2004). Elle joue le rôle d'immunomodulateur pendant l'infection. Elle dégrade des anticorps, les composants du complément C1q et C3, les cytokines et les chémokines (Avidano *et al.*, 1998; Hong and Ghebrehiwet, 1992; Horvat and Parmely, 1988; Leidal *et al.*, 2003; Parmely *et al.*, 1990).

### **7. 1. 3. 2. Les sérine-protéases**

#### **7. 1. 3. 2. 1. La protéase IV (Arginyl peptidase)**

Il s'agit d'une protéase de 26 kDa codée par le gène *prpL* (Traidej *et al.*, 2003; Wilderman *et al.*, 2001b). Elle dégrade les protéines A, D et B du surfactant (Malloy *et al.*, 2005), le fibrinogène, la plasmine, le plasminogène, l'épithélium cornéen, des IgG, le complément et des produits inflammatoires et contribue aussi au pouvoir pathogène de la bactérie (Engel *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1998a ; Engel *et al.*, 1998b; O'Callaghan *et al.*, 1996).

Il est vraisemblable que les protéases LasB, LasA, la protéase alcaline et la protéase IV agissent en synergie pendant l'invasion (Matsumoto *et al.*, 2004; Suter *et al.*, 1994).

#### **7. 1. 3. 2. 2. Las D**

Après clivage d'une protéine de 43 kDa, la CbpD (chitin-binding protein D), le fragment N-terminal de 23 kDa représente la protéase Las D (Braun *et al.*, 1998; Folders *et*

*al.*, 2000; Park and Galloway, 1995). Cette protéase possède la capacité de lyser les bactéries *Staphylococcus aureus* permettant à *P. aeruginosa* de prédominer au niveau du poumon (Park and Galloway, 1998).

#### 7. 1. 4. La leucocidine

La leucocidine est une protéine cytotoxique de 42,5 kDa produite par la plupart des souches pathogènes de *P. aeruginosa* (Homma *et al.*, 1984; Lutz, 1979; Nishiya *et al.*, 1993; Scharmann, 1976a; Scharmann, 1976b). Elle induit la lyse de plusieurs cellules impliquées dans les défenses de l'hôte comme les granulocytes et les lymphocytes (Hirayama and Kato, 1984; Scharmann, 1976c).

#### 7. 1. 5. Les phénazines

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont différentes fonctions biologiques notamment dans la virulence de la bactérie (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Mazzola *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2011). Plusieurs phénazines tel que : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine), l'acide phénazine-1-carboxylique (APC), le 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1-carboxamide (PCN) sont produites par *P. aeruginosa* (Budzikiewicz, 1993). Ces composés ont une activité d'oxydo-réduction. Les deux loci *phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2* sont à l'origine de la production de l'APC. Ce dernier est transformé en pyocyanine et PCN grâce aux trois gènes *phzM*, *phzS*, et *phzH* (Mavrodi *et al.*, 2001).

La pyocyanine est un pigment bleu impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* (Lau *et al.*, 2004). Une grande quantité de ce pigment a été observé au niveau du septum des patients atteints de mucoviscidose. Ceci indique que ce composé joue un rôle dans la détérioration des tissus pulmonaires observés dans une infection chronique (Denning *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 1997; Vukomanovic *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1988). En effet, la pyocyanine réduit la réponse immunitaire de l'hôte (Allen *et al.*, 2005; Leidal *et al.*, 2001), augmente la production de l'IL-8 (Denning *et al.*, 1998; Leidal *et al.*, 2001), induit l'apoptose des neutrophiles et inhibe la prolifération des lymphocytes (Allen *et al.*, 2005). Grâce au pouvoir d'oxydo-réduction de la pyocyanine, le glutathion est oxydé. Par conséquent, la catalase des cellules épithéliales est inactivée et un stress oxydatif s'installe, avec formation de différentes espèces réactives d'oxygène (Britigan *et al.*, 1997; Gloyne *et al.*, 2011; Hassan

and Fridovich, 1980; Muller *et al.*, 2011; O'Malley *et al.*, 2003 ; O'Malley *et al.*, 2004). D'autre part, la pyocyanine pourrait inactiver le canal CFTR en perturbant l'ATPase (Lau *et al.*, 2004). Par ailleurs, la pyocyanine possède une activité antibiotique permettant à *P. aeruginosa* de concurrencer les autres microorganismes (Morales *et al.*, 2010).

### 7. 1. 6. Les pyoverdines

La pyocheline et la pyoverdine sont les deux principaux sidérophores produits et secrétés par *P. aeruginosa*. Les sidérophores sont des petites molécules chélatant le fer de l'environnement afin de l'utiliser dans le métabolisme. Comme le fer est un élément important pour la croissance de *P. aeruginosa*, la pyoverdine est donc nécessaire pour la virulence de la bactérie (Meyer *et al.*, 1996; Takase *et al.*, 2000). La pyoverdine régule sa propre sécrétion ainsi que celle d'autres facteurs de virulence comme l'exotoxine A et une endoprotéase (Lamont *et al.*, 2002).

### 7. 1. 5. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants glycolipidiques résistants à la chaleur. Ils sont composés de rhamnose lié à des acides gras  $\beta$ -hydroxylés. *P. aeruginosa* produit 25 rhamnolipides qui sont différents soit par la longueur de la chaîne ou le degré de saturation de l'acide gras (Déziel *et al.*, 1999). La biosynthèse des rhamnolipides implique 3 enzymes codées par les gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* (Déziel *et al.*, 2003). Plusieurs stimuli environnementaux tels que la densité cellulaire, le stress et la carence nutritionnelle stimulent la biosynthèse des rhamnolipides (Dekimpe and Déziel, 2009; Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2003; McKnight *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003a; Medina *et al.*, 2003b). Cette biosynthèse coïncide avec la phase stationnaire de croissance. Elle est régulée soit au niveau de la transcription soit à un niveau post-transcriptionnel. Parmi les régulateurs impliqués, il y a le quorum-sensing et les systèmes à deux composantes tels que GacS/GacA (Campos-Garcia *et al.*, 1998; Dekimpe and Déziel, 2009; Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2003; Hauser and Karnovsky, 1957; Heurlier *et al.*, 2004; McKnight *et al.*, 2000; Ochsner *et al.*, 1994 ; Ochsner *et al.*, 1995; Pessi *et al.*, 2001; Rahim *et al.*, 2001).

Le rôle des rhamnolipides dans la physiologie de la bactérie est encore mal connu. Néanmoins, ils sont des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. En effet, ils ont été détectés dans le crachat des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont la capacité d'inhiber le

phénomène de clairance ciliaire (Hastie *et al.*, 1986; Kownatzki *et al.*, 1987). En outre, les rhamnolipides jouent un rôle dans le changement de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Al-Tahhan *et al.*, 2000), dans la solubilisation du PQS (Pseudomonas quinolone signal), la mobilité de type « swarming » (Deziel *et al.*, 2003) et dans l'architecture du biofilm (Filloux and Vallet, 2003; Kownatzki *et al.*, 1987). Ils ont une activité antimicrobienne (Wang *et al.*, 2005) et une activité hémolytique (Fujita *et al.*, 1988). En plus, ils inhibent la phagocytose et induisent la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) (Jensen *et al.*, 2007).

### 7. 1. 6. Les lectines

*P. aeruginosa* produit un grand nombre de glycoprotéines incluant deux lectines solubles : I (PA-IL) et II (PA-IIL). Elles sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie et la présence du calcium est essentielle pour qu'elles soient actives. Cependant, la lectine PA-IIL est également présente en grande quantité sur la membrane externe (Glick and Garber, 1983; Tielker *et al.*, 2005). Ces deux lectines représentent deux facteurs de virulences importants pour l'infection. Leur expression est sous le contrôle du système du quorum-sensing (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Winzer *et al.*, 2000).

La lectine PA-IL est codée par le gène *lecA*. Elle est d'une taille de 12.7 kDa et reconnaît le galactose (Gilboa-Garber, 1982; Glick and Garber, 1983; Imberty *et al.*, 2004). Elle pourrait être impliquée dans la formation et la stabilisation du biofilm (Diggle *et al.*, 2006). Elle est également impliquée dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales, dans la perméabilité des cellules aux exoproduits cytotoxiques tel que l'exotoxine A (Kirkeby *et al.*, 2007; Laughlin *et al.*, 2000). Par ailleurs, la lectine PA-IL est directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires et elle inhibe leur croissance (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994; Chemani *et al.*, 2009; Laughlin *et al.*, 2000).

La lectine PA-IIL est codée par le gène *lecB*. Elle est d'une taille de 11.7 kDa et reconnaît le fucose (Gilboa-Garber, 1982; Glick and Garber, 1983; Imberty *et al.*, 2004). Elle est également cytotoxique envers les cellules épithéliales et, elle est impliquée dans la formation du biofilm, dans l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie ou encore bactérie-biofilm (Chemani *et al.*, 2009; Tielker, *et al.*, 2005). En outre, elle inhibe le battement ciliaire des cellules pulmonaires *in vitro* (Adam *et al.*, 1997).

---

## 7. 2. Les facteurs de virulence associés à la bactérie

### 7. 2. 1. Les pili

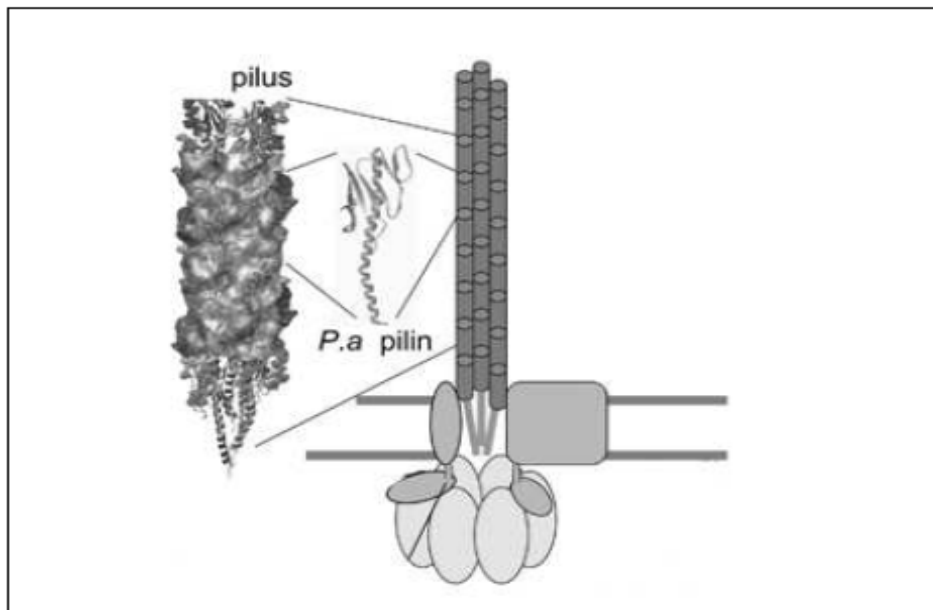
Appelés aussi fimbriae, sont des organelles filamenteuses longues, présentes sur la surface de nombreuses bactéries pathogènes tel que *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis* et *Eikenella corrodens* (Dalrymple *et al.*, 1987; Ottow, 1975; Strom and Lory, 1993; Tennent and Mattick, 1994). Il existe plusieurs classes de pili, les plus répandus sont les pili de type IV (figure 5). Ceux sont des appendices de surfaces, polaires, présents en plusieurs copies sur la surface de la bactérie. Ils ont un diamètre de 6 nm et peuvent atteindre plusieurs micromètres de longueur (Paranchych *et al.*, 1990).

Ces structures sont multifonctionnelles et jouent un rôle crucial en particulier dans l'initiation de la colonisation. En effet, elles permettent l'adhérence de la bactérie aux surfaces épithéliales de l'hôte (Gupta *et al.*, 1994; Paranchych and Frost, 1988; Pier, 1985; Sheth *et al.*, 1994). C'est l'étape la plus importante du processus infectieux (Johanson *et al.*, 1980; Woods *et al.*, 1980). Des mutants de pili sont à l'origine d'une perte de l'adhérence aux pneumocytes et par conséquent de pneumonies moins sévères par rapport à la souche sauvage (Comolli *et al.*, 1999; Farinha *et al.*, 1994). Les pili sont aussi impliqués dans la motilité de type « twitching » qui permet le déplacement sur une surface solide grâce à l'extension puis à la rétraction du pili, et la motilité de type « swarming » (Asikyan *et al.*, 2008; Mattick, 2002; O'Tool and Kolter, 1998). Les pili sont aussi importants pour la formation du biofilm (O'Toole and Kolter, 1998), la transformation naturelle (Dubnau *et al.*, 1999) et l'initiation des infections par des bactériophages dont le pili joue le rôle de récepteur (Bradley, 1973; Henrichsen, 1983).

Le pili de type IV de *P. aeruginosa* est un polymère constitué de plusieurs milliers de copies d'une sous-unité protéique de 15 kDa, appelée la piline (figure 5) (Craig *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2006). La production et l'assemblage de la piline implique l'expression et la régulation d'au moins 40 gènes (Hobbs *et al.*, 1993; Mattick *et al.*, 2002). Ces gènes –appelés *pil*- se trouvent dans différentes régions du chromosome de la bactérie (Darzins and Russell, 1997; Holloway *et al.*, 1994). L'expression de ces gènes est contrôlée par les systèmes à deux composantes *PilS* et *PilR*, et le facteur sigma alternatif RpoN (Hobbs *et al.*, 1993; Ishimoto and Lory, 1989; Ishimoto and Lory, 1992; Boyd *et al.*, 1994).

Il existe d'autres types de pili comme celui dit de type I dont l'assemblage dépend d'une

protéine chaperone CUP (Vallet *et al.*, 2001).



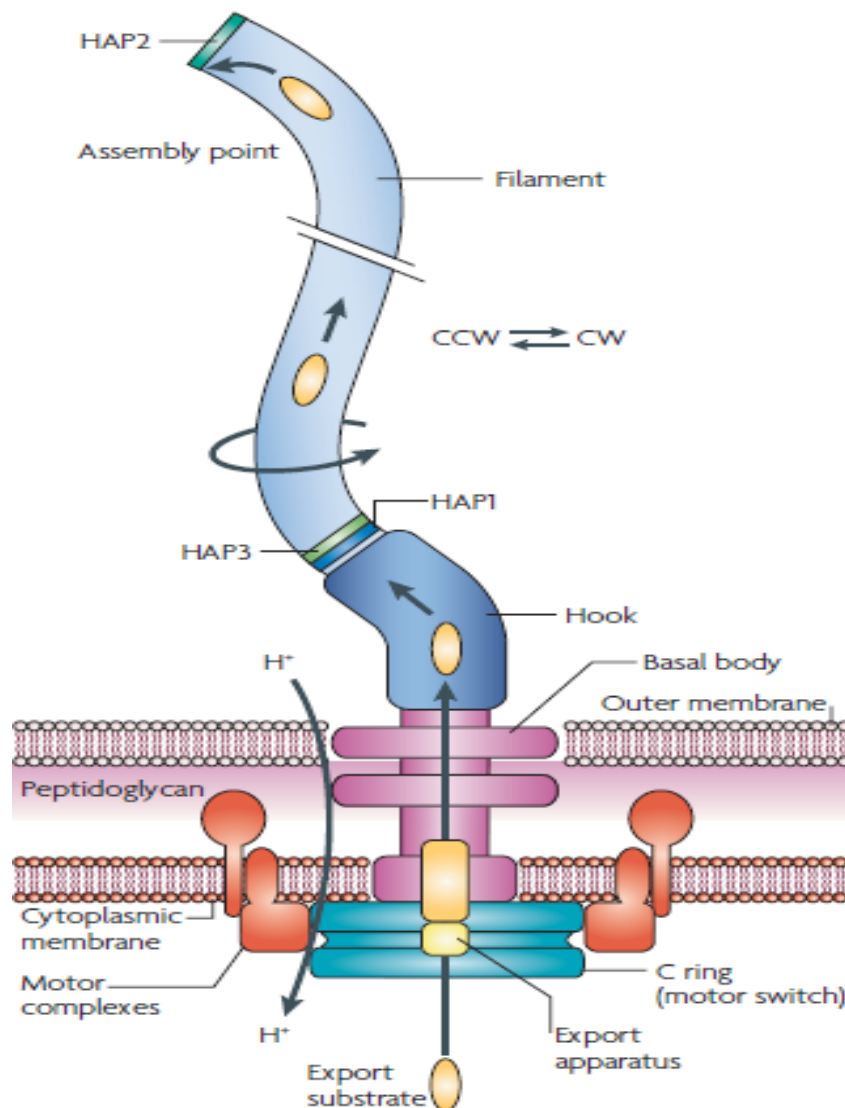
**Figure 5 : Structure du Pilus de type IV de *P. aeruginosa*** (Craig *et al.*, 2006).

### 7. 2. 2. Le flagelle

Le flagelle est une organelle complexe multiprotéique. Il s'agit de l'appendice le plus important dans la motilité des bactéries à Gram négatif. *P. aeruginosa* possède un seul flagelle monotriche polaire lui conférant une mobilité de type « swimming » dans un environnement aqueux et une mobilité de type « swarming » permettant le déplacement sur des surfaces semi solides (Kaiser, 2007; Kohler *et al.*, 2000; McCarter, 2006; Toutain *et al.*, 2005).

Le flagelle est impliqué dans la pathogénie de la bactérie. Des mutants dépourvus de flagelle ont une virulence atténuée (Drake and Montie, 1988; Feldman *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1996). Récemment, il a été démontré que la mutation  $\Delta fliC$  est à l'origine d'une défaillance dans la production des homosérines lactones. Ces molécules sont impliquées dans le quorum-sensing, et elles régulent la production de nombreuses exoprotéases. Parmi celles-ci, certaines à l'origine d'une résistance à la protéine A du surfactant, sont moins produites dans le mutant  $\Delta fliC$ . Ceci rend la clairance de la bactérie plus importante (Kuang *et al.*, 2011). Le flagelle est également nécessaire pour la formation du biofilm. Il intervient dans l'adhérence à la surface et la dissémination du biofilm par la suite (O'Toole and Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002). En outre, cette organelle participe à la reconnaissance de la bactérie par l'hôte en induisant la réponse inflammatoire. Ceci suite à l'interaction entre les monomères de

la flagelline soluble (FliC), libérée par la bactérie, avec les récepteurs Toll TLR5 (Adamo *et al.*, 2004 ; Cobb *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 1998; Honko and Mizel, 2004; Ramos *et al.*, 2004; Steiner, 2007; Szabo, 2003) ou les protéines NLRC4 de l'inflammasome (Arlehamn and Evans, 2011). D'autre part, la flagelline stimule l'expression de la Matrilysine qui est une protéase produite par les cellules épithéliales des muqueuses (Lopez-Boado *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études ont montré que la mobilité induite par le flagelle favorise la phagocytose de la bactérie (Amiel *et al.*, 2010; Lovewell *et al.*, 2011).



**Figure 6 : Structure et assemblage du flagelle bactérien.** Le flagelle bactérien se compose de trois parties: le filament, le crochet et le corps basal. Le gradient de protons à travers la membrane cytoplasmique est essentiel à la rotation du flagelle dans le sens d'une aiguille d'une montre (CW) ou dans le sens contraire (CCW). (HAP : Hook associated protein). (D'après Jarell and McBride, 2008).



Le flagelle bactérien se compose de trois parties (figure 6) : le filament extra bactérien permettant le mouvement, le crochet et le corps basal ancré dans les membranes bactériennes (Minamino *et al.*, 2004; Minamino *et al.*, 2010). Il existe environ 50 gènes codant les protéines de l'appareil du flagelle, les régulateurs et autres (Aldridge and Hughes, 2002). La flagelline est la principale protéine constitutive du flagelle. Ce dernier s'agrandit par l'addition de sous-unités de flagelline à l'extrémité la plus éloignée du corps cellulaire. Ces sous-unités diffusent à travers le domaine creux du flagelle, atteignant ainsi son extrémité. Ceci représente une similarité avec le Système de Sécrétion de Type Trois (SSTT) qui fera l'objet d'une grande partie de cette introduction (Macnab, 2003).

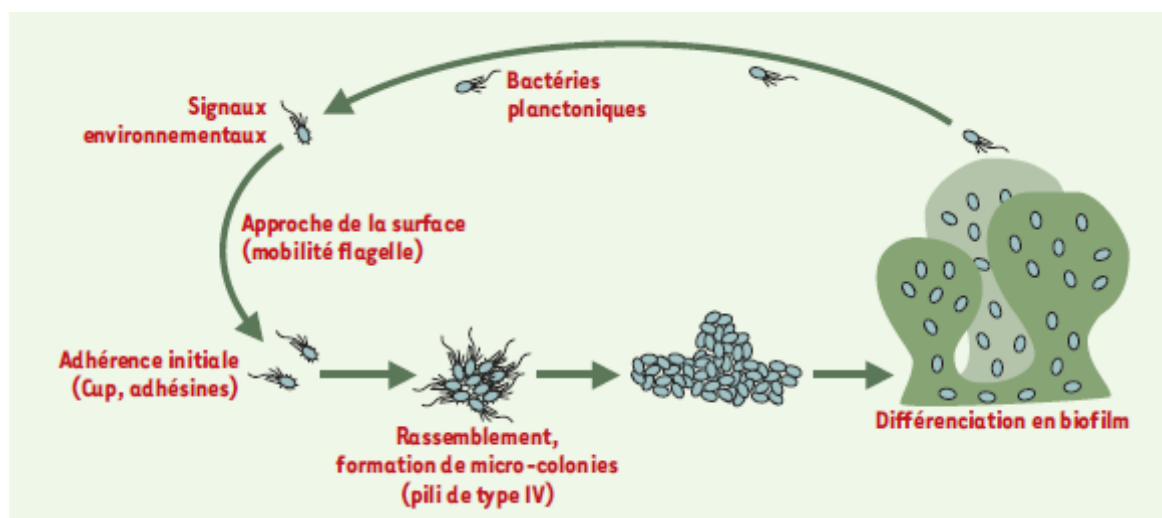
### 7. 2. 3. Le biofilm

L'infection chronique se caractérise par la formation d'un biofilm bactérien, comme c'est le cas dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose. En effet, 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms (Chicurel, 2000). Ces derniers peuvent se former au niveau de cathéters ou d'implants et attaquer des tissus comme les dents, les yeux, les poumons, les oreilles ou le tractus urogénital (Costerton *et al.*, 1999).

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide. La plupart des bactéries vivent aussi à l'état dit « sessile » fixées sur un support (biofilm) plutôt qu'à l'état « planctonique » (libres et isolées dans le milieu environnemental).

À cause de la formation de microcolonies, la distribution des cellules bactériennes est hétérogène au sein du biofilm. Ces cellules occupent 10–20% du volume du biofilm (Costerton *et al.*, 1994). Ce dernier correspond à un mode de vie communautaire. Les bactéries adhèrent à une surface, forment des microcolonies puis synthétisent des substances dont elles s'entourent pour se protéger et renforcer leur adhésion. La structure du biofilm de *P. aeruginosa* est maintenue par une matrice EPS (pour extracellular polymeric substance matrix) (Figure 7) (Costerton *et al.*, 1999) qui joue un rôle dans les interactions entre les différentes cellules d'une même population, les interactions entre les différentes populations du biofilm et l'échange du matériel génétique (Friedman and Kolter, 2004; Jackson *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Yang *et al.*, 2009). Cette matrice est composée essentiellement d'un mélange encore mal défini d'exopolysaccharides : les alginates, les Psl (Polysaccharide Synthesis Locus) et les Pel (pellicule). Les autres

composants minoritaires sont des protéines, des rhamnolipides et de l'ADN (appelé eDNA pour extracellular DNA, il s'agit de l'ADN chromosomique fragmenté suite à la lyse bactérienne) (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Borlee *et al.*, 2010; Branda *et al.*, 2005; Friedman and Kolter, 2004; Jackson *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009; Matsukawa and Greenberg, 2004; Ryder *et al.*, 2007; Whitchurch *et al.*, 2002; Sutherland, 2001). La composition de la matrice dépend des conditions environnementales, de l'âge du biofilm et de la souche impliquée.



**Figure 7 : Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*** (Filloux and Vallet, 2003).

La formation du biofilm nécessite plusieurs étapes et dépend de signaux environnementaux et bactériens dont ceux du quorum sensing (Figure 7) (Davies *et al.*, 1998). Certains de ces signaux environnementaux déclenchent des voies de transduction de signal impliquant les systèmes à deux composantes LadS, RetS, et GacA/S (Goodman *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2009; Ventre *et al.*, 2006). L'étape initiale d'attachement à la surface (muqueuse ou matériel inorganique) dont le flagelle, les pili de type IV, la léctine B (LecB) ou encore les fimbriae Cup sont des appendices de surface, essentiels à la formation du biofilm (Chiang and Burrows, 2003; Déziel *et al.*, 2001; O'Toole and Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002; Tielker *et al.*, 2005; Vallet *et al.*, 2001). L'étape d'attachement irréversible est suivie de deux étapes de maturation qui sont caractérisées par :

1. la formation de macrocolonies et la synthèse de rhamnolipides,
2. la structuration en « champignon », d'une épaisseur maximale de 100  $\mu\text{m}$ . Les bactéries sont complètement immobiles et entourées d'une matrice importante

d'exopolysaccharides. Après altération des macrocolonies, les bactéries des couches internes sont à nouveau mobiles pour aller coloniser d'autres sites. Le biofilm est ainsi dispersé (Figure 7).

Les propriétés du biofilm permettent à *P. aeruginosa* de persister. Ceci en échappant au système immunitaire, à la clairance pulmonaire et accroître la résistance aux antibiotiques (Alkawash *et al.*, 2006; Costerton *et al.*, 1999; Høiby *et al.*, 2010).

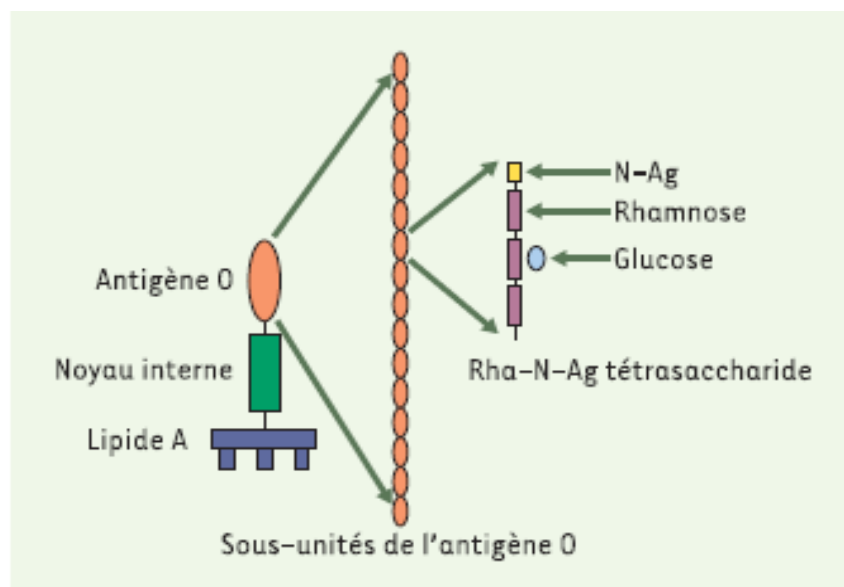
#### 7. 2. 4. Le lipopolysaccharide (LPS)

La face externe de la membrane externe de *P. aeruginosa* est principalement composée de LPS (LipoPolySaccharide). Ce dernier se compose de trois parties (figure 8) :

- Le lipide A, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la bicouche lipidique. Il est possible que cette partie, également appelée endotoxine, est à l'origine de la plupart des activités biologiques du LPS. En effet le lipide A interagit avec les récepteurs eucaryotes asialo-GM1 et TLR4 et entraîne la stimulation de la réponse inflammatoire (Hajjar *et al.*, 2002; Kipnis *et al.*, 2006; Kopp and Medzhitov, 2003; Lynn and Golenbock, 1992; Wieland *et al.*, 2002).
- Un coeur oligosaccharidique hydrophile constitué de chaînes polysaccharidiques. Il se subdivise en un cœur interne et un autre externe. La partie externe semble être le ligand qui s'associe avec la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Cette dernière représente le récepteur pour la fixation de la bactérie aux cellules épithéliales (Pier *et al.*, 1996).
- L'antigène O ou polysaccharide O, une partie polysaccharidique variable débordant de la membrane externe, sur laquelle est basé le sérotypage et l'identification antigénique de *P. aeruginosa* (Rocchetta *et al.*, 1999). Il est possible que cet antigène soit présent (phénotype lisse) ou absent (phénotype rugueux) sur le coeur oligosaccharidique. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent (Cryz *et al.*, 1984).

En plus d'un rôle structural, le LPS est impliqué dans les interactions de la bactérie avec l'environnement. Il est crucial pour la virulence notamment l'adhésion par le biais d'une fixation aux récepteurs TLR4 ou la protéine CFTR (Backhed *et al.*, 2003; Hajjar *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1996) . La fixation à la protéine CFTR dirige la clairance de la bactérie au sein

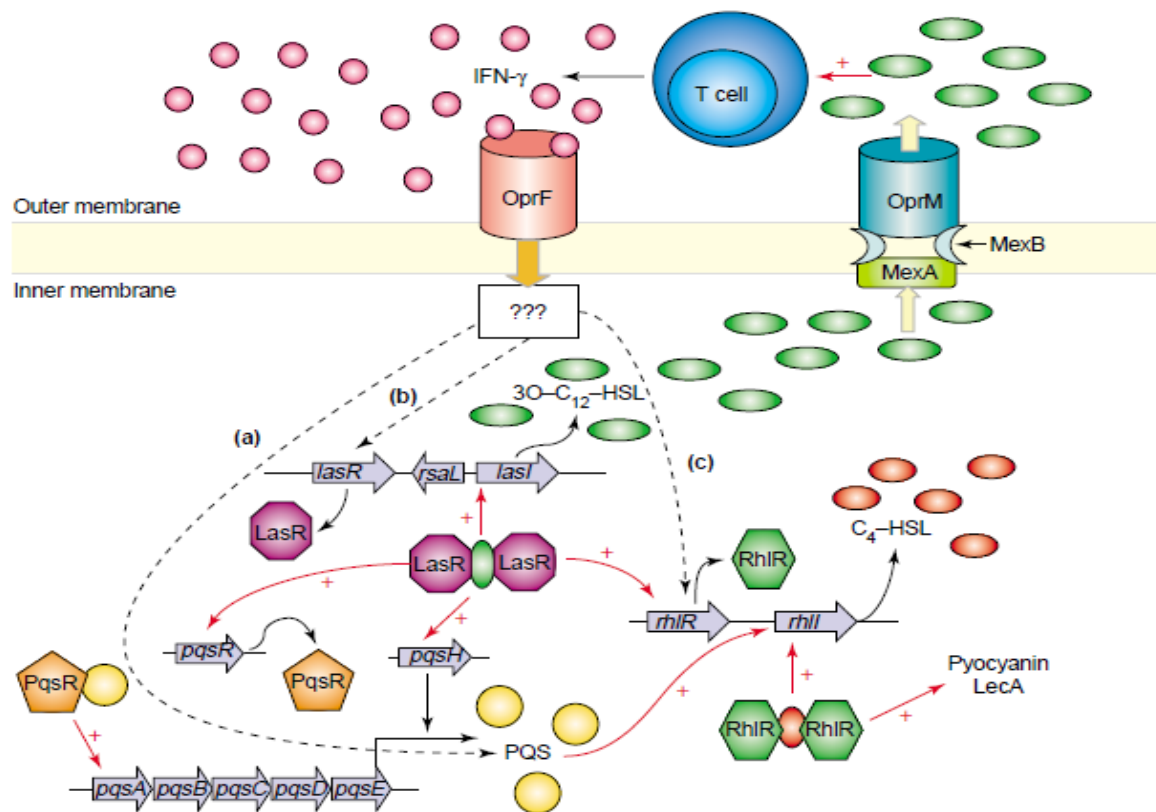
des poumons de patients atteints de la mucoviscidose (Pier *et al.*, 1996; Pier *et al.*, 1997). Pour ces patients, la bactérie s'adapte par des modifications du lipide A (addition de palmitate, d'aminoarabinose et délétion de la fonction 3-hydroxydecanoate). Ceci confère à *P. aeruginosa* une résistance aux peptides antimicrobiens de l'hôte comme la colisine, et permet une activation plus forte des récepteurs TLR4. D'autre part, la perte de l'antigène O (phénotype rugueux) ou de la protéine CFTR permet à la bactérie d'éviter sa reconnaissance par le système immunitaire facilitant ainsi son installation et sa persistance. En outre, la composition de l'antigène O ainsi que sa présence ou absence rend les souches de *P. aeruginosa* plus ou moins résistantes à la phagocytose dirigée par le complément (Cryz *et al.*, 1984; Ernst *et al.*, 1999; Ernst *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2007; Goldberg and Pier, 1996; Hajjar *et al.*, 2002; Nguyen and Singh, 2006; Pier, 2002 ; Schroeder *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'absence de l'antigène O déclenche une surexpression des gènes du SSTT.



**Figure 8 : Structure du lipopolysaccharide (LPS)** (Gilgenkrantz, 2005).

### 7. 2. 5. La protéine OprF

La protéine OprF (Outer membrane protein F) est une porine de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Le diamètre du canal OprF est de 2 nm (Hancock and Nikaido, 1978; Hancock *et al.*, 1979). Cette protéine permet une diffusion non spécifique de certaines espèces ioniques et autres nutriments polaires de petites tailles tels que des polysaccharides ayant un poids moléculaire compris entre 2000 et 3000 daltons (Nestorovich *et al.*, 2006).



**Figure 9 : Modèle d'activation du quorum sensing par l'IFN- $\gamma$ .** La molécule 3O-C<sub>12</sub>-HSL (losanges verts) synthétisée par le régulon *las* est transportée dans le milieu extracellulaire par la pompe d'efflux MexAB-OprM (Smith and Iglewski, 2003). Cette molécule stimule les cellules T pour produire l'IFN- $\gamma$  (circles roses) (Smith and Iglewski, 2003). Ce dernier se fixe sur OprF et un signal est transmis afin de réguler positivement le système *rhl* du quorum sensing, par (a) l'activation du système PQS (Pseudomonas quinolone signal); (b) l'activation du système *las* via un régulateur inconnu (s) ou (c) activation via une voie inconnue. Deux voies ou plus pourraient contribuer à l'effet observé pour le système *rhl*. La régulation positive est indiquée par le symbole (+) et les flèches rouges. D'après Wagner *et al.*, 2006.

La protéine OprF joue un rôle structural dans le maintien de l'intégrité de la paroi bactérienne permettant à *P. aeruginosa* de pousser dans des milieux à faible osmolarité (Finnen *et al.*, 1992; Gotoh *et al.*, 1989; Rawling *et al.*, 1998; Woodruff and Hancock, 1989). Comme une partie de cette porine est en contact avec l'environnement, elle joue un rôle dans les interactions hôte/pathogène. Elle est impliquée dans l'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes et dans la formation du biofilm (Azghani *et al.*, 2002; Baysse *et al.*, 2005; Hassett *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2002). Il est possible que la protéine OprF joue le rôle de senseur pour le système immunitaire de l'hôte. En effet, l'interféron gamma interagit avec cette protéine conduisant à la production de certains facteurs de virulence via l'activation du quorum sensing (figure 9) (Ding *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2005). D'autre

part, des études ont montré que cette protéine est immunogénique (Gilleland *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2002).

La protéine OprF est importante pour la virulence de *P. aeruginosa*. L'absence de cette protéine est à l'origine d'une atteinte de l'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes, de la sécrétion des exotoxines du SSTT, de la production de la pyocyanine, de l'élastase, de la lectine PA-1L et de la production de l'exotoxine A. Dans un mutant OprF, la production des molécules du quorum-sensing et du PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) est également atteinte (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2005).

### 7. 2. 6. L'alginate

Les alginates sont des exopolysaccharides visqueux et extracellulaires produites par *P. aeruginosa* durant les deux phases aiguë et chronique de l'infection. Ils sont composés de polymères répétés d'acide mannuronique et d'acide glucuronique et, donnent à la bactérie un aspect mucoïde (Evans and Linker, 1973; Shankar *et al.*, 1995).

La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des alginates sont regroupés sur un opéron contenant 12 gènes : *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF*, et *algA* (Chitnis and Ohman, 1993; Schurr *et al.*, 1993; Shankar *et al.*, 1995). Les gènes *algR*, *algP*, *algQ* et *algB* régulent la biosynthèse des alginates (Gacesa, 1998; Shankar *et al.*, 1995).

Comme le LPS, les alginates sont impliqués dans l'adhésion de la bactérie à l'épithélium respiratoire (Doig *et al.*, 1987). L'environnement des poumons de patients atteints de mucoviscidose et la réponse inflammatoire de l'hôte permettent d'augmenter la synthèse des alginates. Ceci est à l'origine de la conversion de la bactérie vers un phénotype mucoïde surproduisant des alginates (Davies *et al.*, 2002; Mathee *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 1992). Cette surproduction d'alginates protège *P. aeruginosa* des antibiotiques. Elle permet également d'atténuer la réponse immunitaire en inhibant l'activation du complément, en réduisant le chimiotactisme des polymorphonucléaires et en diminuant la phagocytose (Bayer *et al.*, 1991; Cabral *et al.*, 1987; Cobb *et al.*, 2004; Hatch and Schiller, 1998; Hentzer *et al.*, 2001; Learn *et al.*, 1987; Lyczak *et al.*, 2002; Nivens *et al.*, 2001; Oliver and Weir, 1985; Pier *et al.*, 2001).

Les alginates ont été largement considérés comme les exopolysaccharides majeurs de la matrice du biofilm. Cependant, des études ont montré qu'ils ne sont pas cruciaux au développement du biofilm (Hentzer *et al.*, 2001; Stapper *et al.*, 2004; Wozniak *et al.*, 2003).

En effet, les exopolysaccharides Psl (polysaccharide synthesis locus) et Pel (pellicle) sont impliqués dans la formation et le développement du biofilm et sont des composants indispensables de l'EPS des souches non-mucoïdes (Friedman and Kolter, 2004; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa and Greenberg, 2004; Ryder *et al.*, 2007; Vasseur *et al.*, 2005).

### 7. 3. Les systèmes de sécrétion

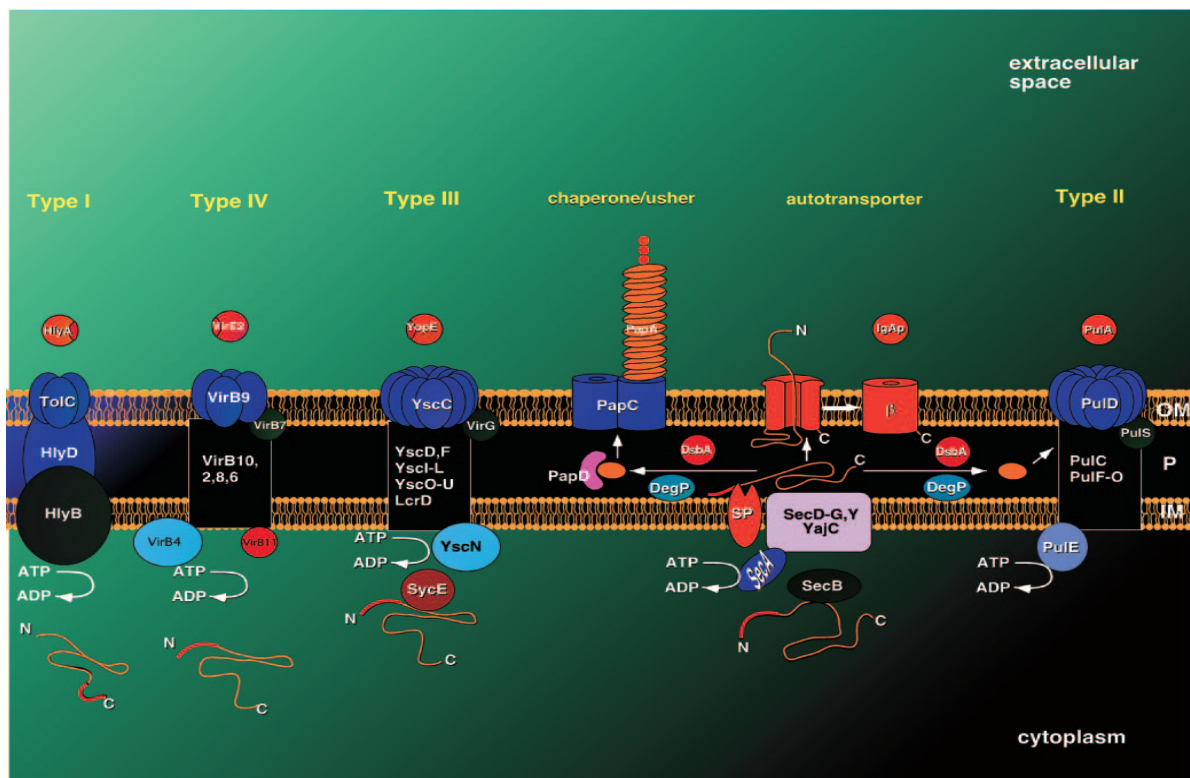
L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif comme *P.aeruginosa* est composée de deux membranes hydrophobes, la membrane interne et la membrane externe. Les deux membranes sont séparées par un espace périplasmique hydrophile. Or, il est important pour la bactérie d'établir des communications avec l'environnement. En effet, les bactéries libèrent dans le milieu extracellulaire des protéines dont des enzymes pour transformer des macromolécules en nutriments utilisables par la bactérie. D'autre part, les bactéries pathogènes délivrent des facteurs de virulence directement dans les cellules de l'hôte pour perturber ses défenses et utiliser ses voies de signalisation à son profit ou utiliser l'hôte lui-même comme une niche de réplication (Cossart and Sansonetti, 2004; Merrell and Falkow, 2004).

Cependant, les protéines secrétées sont généralement des molécules hydrophiles qui doivent traverser l'environnement hydrophobe de la membrane bactérienne. La plupart des facteurs de virulence secrétés doivent également traverser la membrane des cellules de l'hôte afin d'être délivrés directement dans le cytoplasme de ces cellules. Pour se faire, la bactérie possède des complexes macromoléculaires, plus ou moins sophistiqués, appelés des systèmes de sécrétion. Ces derniers permettent le passage de différentes molécules et, sont généralement conservés dans les bactéries à Gram-négatif (Bleves *et al.*, 2010; Desvaux *et al.*, 2009; Filloux *et al.*, 1990). La sécrétion via ces systèmes est achevée en une étape ou deux (Choo *et al.*, 2009; Papanikou *et al.*, 2007). Les systèmes de sécrétion sont classés en deux groupes : Sec dépendant et Sec indépendant (Hueck, 1998). À ce jour, six ou sept différents types de systèmes de sécrétion ont été découverts (figure 10). *P.aeruginosa* possède tous ces systèmes sauf celui du type IV (Ma *et al.*, 2003). Le système de sécrétion de type III représente un facteur de virulence majeur.

#### 7. 3. 1. Les systèmes de sécrétion Sec dépendant

Les systèmes de sécrétion Sec dépendant permettent aux protéines substrats de traverser la membrane externe. De ce fait, une première étape de sécrétion dans le périplasma est

nécessaire. Cette étape est réalisée par une voie générale de sécrétion de la membrane interne qui est la voie Sec. Les protéines ainsi secrétées possèdent un peptide signal dans la partie N-terminale. Après le clivage de ce peptide, la protéine est libérée dans le périplasm (Choo *et al.*, 2009; Economou, 1999). La voie Sec comprend une ATPase (SecA), des protéines du translocon (SecYEG), une chaperonne (SecB) se fixant au peptide signal de la protéine à sécréter, une peptidase périplasmique pour le clivage du peptide signal et autres protéines (SecD, YajC, YidC) (Hueck, 1998; Papanikou *et al.*, 2007; Scotti *et al.*, 2000). *P. aeruginosa*



**Figure 10 : Présentation schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines connus chez les bactéries à Gram négatif.** La sécrétion de l'hémolysine A (HlyA) d'*E.coli* est donnée en exemple pour le type I, la sécrétion de la protéine VirE2 d'*Agrobacterium tumefaciens* pour le type IV, la sécrétion de l'exotoxine (YopE) de *Y.pestis* pour le type III, la sécrétion de la protéine P du pilus (PapA) d'*E. coli* uropathogénique par la système chaperone/usher, la sécrétion de la protéase IgA1 (IgAp) de *Neisseria gonorrhoeae* pour le système autotransporteur et la sécrétion de la pullulanase (PulA) de *Klebsiella oxytoca* pour le type II. P : périplasm, SP : peptide signal, IM : membrane interne, OM : membrane externe (Kostakioti *et al.*, 2005).



possède toutes ces protéines (Ma *et al.*, 2003). Il existe une autre voie d'export de la membrane interne, c'est la voie Tat (Twin arginine translocation). Elle a la capacité à transporter des protéines repliées (Sargent, 2007; Voulhoux *et al.*, 2001).

Les systèmes de sécrétion Sec dépendant incluent le système de sécrétion de type II, le système de sécrétion de type V et le système de sécrétion chaperone/usher (Kostakioti *et al.*, 2005).

### 7. 3. 1. 1. Le système de sécrétion de type II

Dans ce type de sécrétion, la molécule substrat est transloquée à travers la membrane interne par la voie Sec ou Tat. Les molécules sont transloquées une deuxième fois à travers la membrane externe via le système de sécrétion de type II (SSTII).

Les protéines substrats sont dotées d'un peptide signal en N-terminal permettant, selon sa nature, aux protéines d'être prises en charge soit par le système Tat soit par le système Sec (Voulhoux *et al.*, 2001). Dans le périplasma, le peptide signal est clivé par une peptidase. Les protéines à sécréter doivent avoir leur conformation tridimensionnelle finale pour une reconnaissance par le SSTII. Celles transloquées via la voie Sec ne sont pas repliées. C'est dans le périplasma qu'elles se replient. Cependant, les protéines sont transloquées repliées via la voie Tat (Braun *et al.*, 1996; Kessler and Safrin, 1994; McIver *et al.*, 1995; McIver *et al.*, 2004; Voulhoux *et al.*, 2000).

Le SSTII est composé d'un pseudo-pilus supposé traverser l'espace périplasmique et d'un pore formé dans la membrane externe, composé de multimères d'une protéine de la famille des sécrétines. En plus de ces deux composants, le complexe de la machinerie Tat ou Sec situé au niveau de la membrane interne est nécessaire (Johnson *et al.*, 2006).

*P. aeruginosa* possède deux SSTII complets, les systèmes Xcp et Hcx (Ball *et al.*, 2002; Voulhoux *et al.*, 2001).

Le système Xcp est codé par un cluster de 11 gènes *xcpP-Z* (Filloux, 2004). Les protéines codées par ces gènes sont similaires aux protéines Pul impliquées dans la sécrétion de la pullulanase (PulA) par le SSTII de *Klebsiella oxytoca* (Akrim *et al.*, 1993; Bally *et al.*, 1992; d'Enfert *et al.*, 1987; Filloux *et al.*, 1990). La protéine XcpA appelé aussi Pild est essentielle pour la fonction du SSTII (Bally *et al.*, 1991; Bally *et al.*, 1992; Nunn and Lory, 1991). Le système Xcp transporte environ 14 protéines, parmi lesquelles, les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A, des phospholipases C, des lipases, une phosphatase alcaline (PhoA)

(Bever and Iglewski, 1988; Filloux *et al.*, 1987; Filloux *et al.*, 1989; Filloux *et al.*, 1998; Wohlfarth *et al.*, 1992; Wretling and Pavlovskis, 1984; Ostroff and Vasil, 1987).

Le système Hcx (homologous to xcp) comporte également 11 gènes *hxcP-Z* (Ball *et al.*, 2002). La protéine XcpA (PilD) est aussi essentielle pour sa fonction. Ce système transporte une phosphatase alcaline (LapA) dite de bas poids moléculaire. Le gène *LapA* se trouve dans le même cluster des gènes *Hcx*. De ce fait, il est vraisemblable que le système Hcx soit dédié uniquement au transport de la protéine LapA.

Un troisième système incomplet, XphA/XqhA, a été identifié (Michel *et al.*, 2007). Les protéines XphA et XqhA peuvent former un SSTII hybride et fonctionnel en interagissant avec les protéines XcpR et XcpZ. À la différence des gènes *xcpR* et *xcpZ*, les gènes *xphA* et *xqhA* sont transcrits pendant la phase précoce de la croissance bactérienne. Les tandems protéiques XphA/XqhA et XcpP/XcpQ seraient donc impliqués dans le processus de sécrétion à des stades différents de la croissance (Michel *et al.*, 2007).

### 7. 3. 1. 2. Le système de sécrétion de type V

Le système de sécrétion de type V (SSTV) représente la voie de sécrétion la plus simple. Elle est très répandue dans les bactéries à Gram-négatif. Ce système a été décrit initialement chez *Neisseria gonorrhoeae* pour la protéase IgA (Pohlner *et al.*, 1987). Le processus de sécrétion est réalisé en deux étapes. Dans un premier temps, la protéine substrat traverse la membrane interne via le système Sec. Dans un deuxième temps, des feuillettes  $\beta$  de la protéine substrat forment un canal dans la membrane externe qui servira pour le passage de la protéine à sécréter. Cette dernière reste soit attachée à la membrane externe soit libérée dans le milieu extracellulaire après une protéolyse. Il existe deux types du SSTV : les systèmes autotransporteurs (AT ou Type Va et Type Vc) et la voie de sécrétion à deux partenaires (Type Vb ou TPS) (Dautin and Bernstein, 2007; Desvaux *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2008).

Les protéines transportées par les systèmes autotransporteurs sont caractérisées par : un peptide signal en N-terminal, un domaine en C-terminal composé de feuillettes  $\beta$ , et entre les deux, un domaine « Passager » portant l'activité catalytique de la protéine (Sauri *et al.*, 2009). Le peptide signal permet l'export de la protéine à travers la membrane interne par le système Sec. Après, il est clivé. Quand la protéine est dans le périplasma, le domaine C-terminal s'insère dans la membrane externe pour former un pore en tonneau  $\beta$ . Le domaine « Passager »

est ensuite transloqué à la surface de la bactérie via ce pore où il peut subir d'autres modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité. Ce domaine est soit maintenu attaché à la surface soit libéré par autoprolyse ou par l'activité d'une autre protéase (Coutte *et al.*, 2003; Hendrixson *et al.*, 1997; Shere *et al.*, 1997; van Ulsen *et al.*, 2003). Une séquence interne « auto-chaperonne » dans le domaine « passager » ainsi que d'autres protéines chaperons périplasmiques sont impliquées dans ce type de transport (Gerlach and Hensel, 2007).

Dans le Type Va, un seul monomère forme le tonneau  $\beta$ . Cependant, ce tonneau est formé par un homotrimère dans le Type Vc (Nummelin *et al.*, 2004; Surana *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2004).

Le génome de *P.aeruginosa* PAO1 contient trois gènes codant des protéines typique du système autotransporteur. Les deux gènes PA3535 et PA0328 codent pour des exoprotéines dont les activités prédites sont une protéase à sérine et une métalloprotéase respectivement (Filloux *et al.*, 2003; Stover *et al.*, 2000; <http://v2.pseudomonas.com/>). La protéine EstA est la seule protéine autotransporteur caractérisée chez *P.aeruginosa*. Elle possède une activité estérase dans son domaine « passager » (Wilhelm *et al.*, 1999). Elle est impliquée dans la production des rhamnolipides, la mobilité et la formation du biofilm (Wilhelm *et al.*, 2007). Récemment, un quatrième autotransporteur PlpD a été identifié (Salacha *et al.*, 2010). La protéine PlpD possède une activité lipase et elle est membre de la famille PLPs (patatin-like proteins) (Banerji and Flieger, 2004).

Dans la voie de sécrétion à deux partenaires (Type Vb ou TPS), le domaine « passager » et le domaine  $\beta$  sont deux protéines indépendantes : TpsA et TpsB respectivement (Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Mazar and Cotter, 2007). La protéine TpsA contient un motif TPS de sécrétion et le domaine catalytique. Le domaine  $\beta$  de la protéine TpsB est précédé d'un ou plusieurs domaines POTRA (polypeptide transport-associated). Ces derniers sont impliqués dans les interactions protéine/protéine. Dans le cas de TpsB, les domaines POTRA sont nécessaires pour le recrutement de la protéine TpsA (Voulhoux and Tommassen, 2004). Les deux protéines TpsB et TpsA sont sécrétées dans le périplasme par le biais du système Sec. La protéine TpsA est synthétisée sous forme d'une pré-pro-protéine qui devient une pro-protéine après maturation de son peptide signal. Une fois la protéine TpsB insérée dans la membrane externe, elle recrute la protéine TpsA via un de ces domaines POTRA qui interagit avec le motif Tps de la protéine TpsA (Clantin *et al.*,

2004; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007). La pro-protéine TpsA est clivée, donnant ainsi la protéine TpsA mature (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Cette dernière reste accrochée à la membrane ou libérée dans le milieu extracellulaire. Contrairement aux systèmes autotransporteurs dont le tonneau  $\beta$  est composé de 12 feuillets  $\beta$ , le tonneau  $\beta$  du système TPS est composé de 16 feuillets  $\beta$  (Clantin *et al.*, 2007; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Oomen *et al.*, 2004).

*P. aeruginosa* possède 6 systèmes de Type Vb (TPS), 5 complets (TPS1-5) et un cargo TspA6 orphelin dont les exoprotéines putatives seraient des hémagglutinines et des adhésines (Ma *et al.*, 2003). Le gène *TspA6* est situé dans le même cluster des gènes *cupB*. Ces derniers codent la voie chaperone/usher impliquée dans l'assemblage des fimbriae CupB. Cette voie est également impliquée dans la sécrétion de la protéine TspA6 (Ruer *et al.*, 2008).

### 7. 3. 1. 3. Le système de sécrétion chaperone/usher

Bien que la voie chaperon/Usher (Cup : chaperone/usher pathway) soit la mieux caractérisée en termes de mécanismes moléculaires et les détails structuraux, elle a été longtemps oubliée (Waksman and Hultgren, 2009). Cette voie est impliquée dans la sécrétion et l'assemblage du pili. Elle nécessite deux composantes protéiques : des chaperones périplasmiques et une protéine de la membrane externe appelée « usher » (Kostakioti *et al.*, 2005).

Les sous-unités de la fibrine traversent la membrane interne grâce à la voie Sec. Dans le périplasma, elles interagissent avec les protéines chaperonnes de la voie chaperone/usher afin d'éviter des mauvaises conformations et permettant ainsi leur sécrétion. La protéine dite « usher » s'oligomérisent et forme un canal permettant aux sous-unités de la fibrine de traverser la membrane externe. Ces sous-unités forment un filament qui reste attaché à la membrane.

Dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1 quatre clusters de gènes *cup* ont été identifiés : *cupA*, *cupB*, *cupC*, et *cupE* (Giraud *et al.*, 2011; Vallet *et al.*, 2001). Chaque cluster comprends un gène codant une protéine « usher » et un ou deux gènes codant des chaperonnes. La souche de *P. aeruginosa* PA14 possède un autre cluster de gène *cup* : *cupD* (Mikkelsen *et al.*, 2009; Nicastro *et al.*, 2009). Le système Cup est impliqué dans la formation du biofilm (Vallet *et al.*, 2001).

### 7. 3. 2. Les systèmes de sécrétion Sec indépendants

Pour ces systèmes, la sécrétion est achevée en une seule étape. La machinerie de sécrétion est caractérisée par un canal continu constitué d'une ou plusieurs protéines traversant l'enveloppe cellulaire. Les protéines à sécréter transitent directement du cytosol au milieu extracellulaire sans passer par le périplasme. Si le système est défectueux, les protéines substrats sont probablement dégradées dans le cytosol. Les systèmes de sécrétion Sec indépendant incluent le système de sécrétion de type I, le système de sécrétion de type IV (il peut également être Sec dépendant), le système de sécrétion de type III et le système de sécrétion de type VI (Kostakioti *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2003).

#### 7. 3. 2. 1. Le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (SSTI) est composé d'une protéine spécifique de la membrane externe appelée OMP (Outer Membrane Protein) qui forme un tonneau  $\beta$  renfermant un pore hydrophile, d'un ABC transporteur (ATP Binding Cassette) inséré dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport, et d'une protéine dite de « fusion membranaire » (MFP), ancrée dans la membrane interne qui relie l'ABC transporteur à l'OMP (Delepelaire, 2004; Holland *et al.*, 2005).

Les protéines à sécréter possèdent, en C-terminal, un signal de sécrétion non clivable (Duong *et al.*, 1996; Hueck, 1998). Elles interagissent avec l'ABC transporteur et la protéine MFP et, sont sécrétées non repliées (Binet *et al.*, 1997). Le signal de sécrétion interagit avec le domaine NBD (nucleotide binding domain) de l'ABC transporteur. Cette interaction est à l'origine d'un changement conformationnel conduisant à l'hydrolyse de l'ATP. L'énergie résultante servira pour le passage de la protéine à sécréter dans le SSTI (Holland *et al.*, 2005).

L'exemple typique est le système de sécrétion de l' $\alpha$ -hemolysin (HlyA) d'*E. coli* (Koronakis *et al.*, 1989). Chez *P. aeruginosa*, deux SSTI ont été bien étudiés : Apr et HasDEF (Ma *et al.*, 2003). Le système Apr est impliqué dans la sécrétion de la protéase alcaline AprA et la protéine AprX (fonction non connue) (Guzzo *et al.*, 1991; Duong *et al.*, 2001). Le système HasDEF est impliqué dans l'utilisation du fer. Il sécrète la protéine HasAp qui chélate des ions de l'hème de l'hémoglobine (Wandersman and Delepelaire, 2004).

---

### 7. 3. 2. 2. Le système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV est caractérisé par sa polyvalence. Il a la capacité de sécréter des protéines (cytotoxine CagA de *Helicobacter pylori*) ou des complexes nucléoprotéiques (fragment T du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*) d'une façon dépendante ou non du contact cellulaire (Cascales and Christie, 2003; Llosa and O'Callaghan, 2004). Cette sécrétion est également réalisée par un mécanisme indépendant de la machinerie Sec, sauf pour la toxine pertussique de *Bordetella pertussis* (Cascales and Christie, 2003). Aucun système de sécrétion de type IV n'a été mis en évidence chez *P. aeruginosa*.

L'appareil de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens* est constitué de 4 groupes fonctionnels de protéines (Beijersbergen *et al.*, 1994; Burns, 1999; Cascales et Christie, 2003) : (i) deux ATPases cytoplasmiques associées à la membrane interne qui fournissent l'énergie nécessaire au processus de sécrétion, (ii) un canal transmembranaire qui traverse les membranes interne et externe de la paroi, permettant le passage de la molécule vers l'extérieur, (iii) un pilus à la surface de la bactérie qui permet le contact avec la cellule eucaryote, (iv) un canal transmembranaire permettant la translocation des complexes ADN-protéines dans le cytoplasme de la cellule cible. Au cours de l'infection des plantes, et via ce système, *A. tumefaciens* transfère au moins 3 macromolécules : le T-DNA oncogénique, la protéine VirE2 fixant l'ADN simple brin et la protéine VirF (Christie, 2001).

### 7. 3. 2. 3. Le système de sécrétion de type VI

Il a été décrit pour la première fois chez *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) pour l'export, dans le milieu extracellulaire, des protéines Hcp (hemolysin-coregulated protein) et VgrG (valine-glycine repeat). Ces protéines ne possèdent pas de peptide signal. La protéine VgrG est structurellement homologue à la queue du bacteriophage T4 (Pukatzki *et al.*, 2007). Les clusters de gènes codant pour ce système ont été nommés IAHP, pour « IcmF-Associated Homologous Proteins », car ils contiennent un gène codant pour la protéine IcmF associée au système de sécrétion de type IVb de *L. pneumophila*. Les composants communs à tous les systèmes de sécrétion de type VI (SSTVI) incluent les protéines « IcmF- et IcmH- like » du SSTIV, une lipoprotéine, l'ATPase Clp et les protéines Hcp et VgrG (Cascales, 2008).

Le système de sécrétion de type VI (SSTVI) correspond au système de sécrétion le plus récemment découvert chez *P. aeruginosa*. Dans cette bactérie, il existe trois clusters renfermant 15 à 20 gènes impliqués dans la fonction de ce système (Filloux *et al.*, 2008). Ces

trois clusters codent pour trois machineries du SSTVI appelés initialement HSI-1, HSI-2 et HSI-3 (pour Hcp Secretion Island) (Mougous *et al.*, 2006). Plus tard, les trois groupes ont été rebaptisés H1-T6SS, H2-T6SS et H3-T6SS (Hood *et al.*, 2010). Le plus étudié est le H1-T6SS. Dix gènes *vgrG* et cinq gènes *hcp* ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Hachani *et al.*, 2011). Certains de ces gènes font partis du même cluster des gènes du SSTVI. Les gènes *hcp1*, *vgrG1a* et *vgrG1b* sont associés au cluster H1-T6SS. Les deux protéines Hcp1 et VgrG1a sont supposées être secrétées par le SSTVI (Hachani *et al.*, 2011; Hood *et al.*, 2010; Mougous *et al.*, 2006). Cependant, la structure d'Hcp1 (Mougous *et al.*, 2006) et VgrG1a (Hachani *et al.*, 2011; Leiman *et al.*, 2009) montrent que ces deux protéines peuvent former un complexe multimérique. Ces deux protéines font probablement partie de la machinerie de sécrétion et ne seraient pas des effecteurs. Récemment, trois effecteurs du système H1-T6SS ont été identifiés : Tse1–3 (type six exported) (Hood *et al.*, 2010). Les trois systèmes HSI-1, HSI-2 et HSI-3 sont régulés différemment, ce qui laisse supposer qu'ils ont des rôles différents. Le système HSI-I est régulé par les systèmes à deux composants et les petits ARN non codants (Goodman *et al.*, 2004; Mougous *et al.*, 2006). Les deux systèmes HSI-II et III ne le sont pas. En outre, le quorum-sensing réprime le système HSI-I et stimule les deux systèmes HSI-II et III (Lesic *et al.*, 2009).

Il n'est pas encore établi si le SSTVI secrète en une seule ou deux étapes. Les protéines secrétées ne sont pas clairement identifiées. On ne sait encore pas si le SSTVI exporte ou secrète des macromolécules, ADN,...etc.

#### **7. 3. 2. 4. Le système de sécrétion de type III**

Le système de sécrétion de type III (SSTT) permet comme les systèmes de type IV et VI de délivrer directement des effecteurs dans le cytosol des cellules de l'hôte. Ceci en traversant non seulement l'enveloppe bactérienne, mais également la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Cornelis *et al.*, 2002). La sécrétion via ce système nécessite un signal environnemental qui est habituellement le contact avec les cellules de l'hôte. Elle nécessite également des protéines cytosoliques jouant le rôle de protéines chaperonnes.

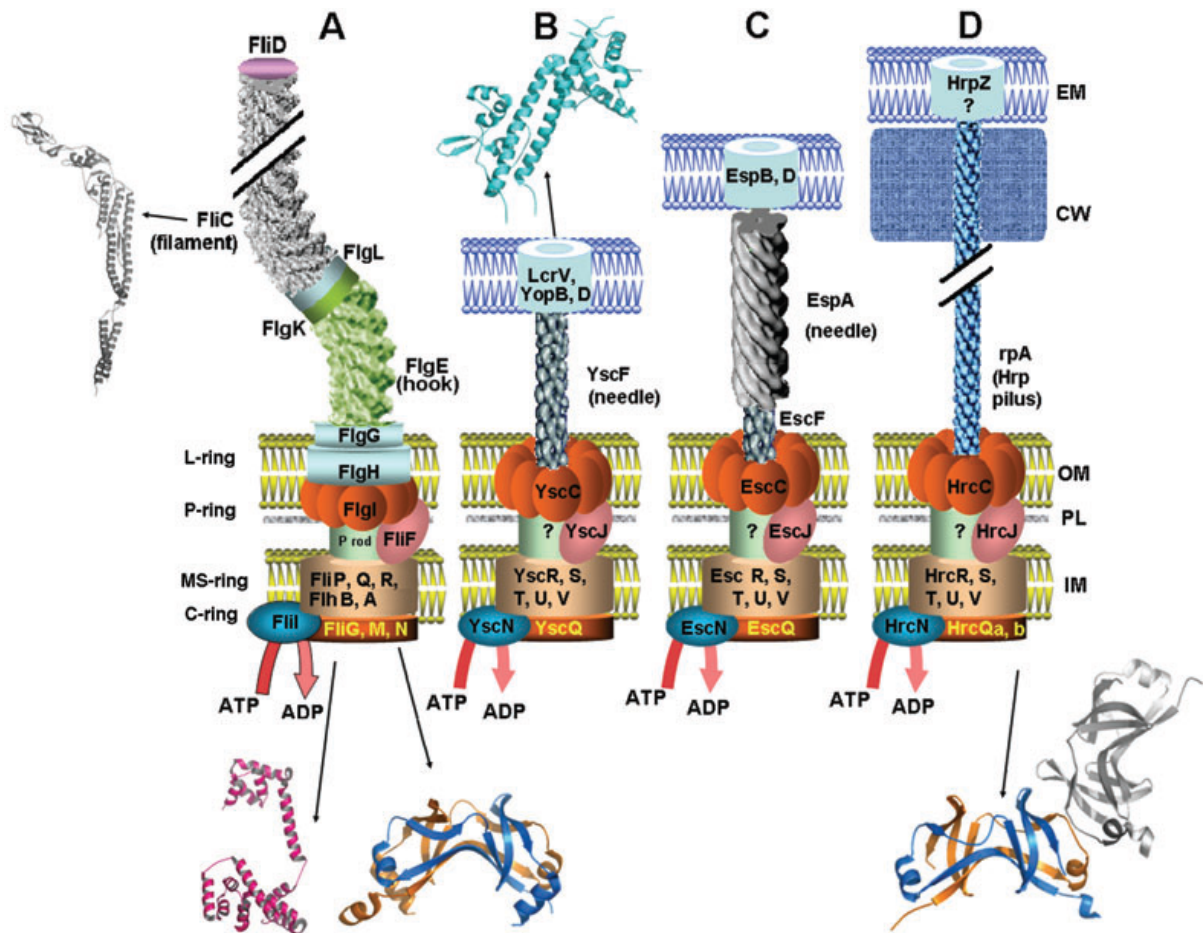
Ce système a été caractérisé pour la première fois chez *Yersinia* (Hueck, 1998). Les SSTTs sont très utilisés par les bactéries à gram-négatif. Ils sont présents dans les bactéries symbiotiques et pathogènes (majoritairement) pour l'homme, les animaux, les plantes et les insectes, parmi lesquelles :

- Des pathogènes humains et animaux : *Yersinia spp.*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* entéropathogénique (ECEP), *P. aeruginosa* et *Chlamydia spp.*, *S. typhimurium* et *Yersinia spp.*, possèdent deux SSTTs.
- Des pathogènes de plantes comme : *P. syringae*, *Erwinia spp.*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* et *Rhizobium spp* (Hueck, 1998).
- Des SSTTs sont également présents dans des microorganismes commensaux comme : *Photobacterium luminescens*, *Sodalis glossinidius*, *Sitophilus zeamais*, des *rhizobia* symbiotiques et certains procaryotes non pathogènes (*P. fluorescens*) (Tampakaki *et al.*, 2004).

Le SSTT consiste en trois grands types de protéines : (i) les composants structuraux de l'appareil de sécrétion/injection (ii) les effecteurs qui sont les protéines secrétées et (iii) les facteurs de régulation qui contrôlent l'expression des deux premiers types (Galan and Collmer, 1999). Le SSTT est codé par des clusters de gènes localisés sur des plasmides (*Yersinia pestis*, *S. flexneri*, et *R. solanacearum*) ou sur le chromosome dans des îlots de pathogénicité par exemple (*S. typhimurium*, *EPEC*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *E. Amylovora* and *X. campestris*). Environ 10 des protéines qui composent l'appareil de sécrétion (figure 6) présentent une forte similitude de séquence et de fonction avec des composants du flagelle (Blocker *et al.*, 2003; Yip and Strynadka, 2006). Les observations par microscopie électronique des parties basales du SSTT et du flagelle ont révélé qu'elles sont ancrées dans les deux membranes bactériennes et qu'elles présentent de fortes similitudes structurales (figure 11) (Blocker *et al.*, 2001; Blocker *et al.*, 2003; Gophna *et al.*, 2003; Kubori *et al.*, 1998; Tampakaki *et al.*, 2004; Yip and Strynadka, 2006). Cependant, les gènes codant les effecteurs sont entièrement différents (Hueck, 1998). Les effecteurs du SSTT ressemblent à certains facteurs des cellules eucaryotes impliqués dans des voies de transduction de signal (Lesser and Leong 2011). Par conséquent, ces effecteurs peuvent interférer avec ces voies et perturbent le système immunitaire ou provoquent une réorganisation du cytosquelette ce qui favorise la colonisation (Hueck, 1998).

Selon la nature des toxines transloquées, qui sont spécifiques de chaque espèce bactérienne, le SSTT peut permettre l'internalisation de la bactérie, l'induction de l'apoptose des cellules cibles, la régulation de l'inflammation ou la création des relations symbiotiques (Coburn *et al.* 2007; Pallen *et al.*, 2005).





**Figure 11 : Structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif.** A, structure du flagelle ; B, C, D, SSTT de *Yersinia spp.*, de *E. coli* et de *P. syringae* respectivement. Seules les protéines conservées entre les différents SSTT (et leurs homologues chez le flagelle) sont représentées et identifiées par des couleurs et des positions similaires. Le « P rod » du flagelle n'a pas de protéine homologue connue chez les SSTT. Le point d'interrogation signifie qu'une structure de type canal au niveau de la membrane interne n'a pas encore été identifiée. Le constituant majeur de l'aiguille (needle ou Hrp pilus) est YscF chez *Yersinia spp.*, EspA chez *E. coli*, HrpA chez *P. syringae*. Les protéines formant le pore dans la membrane eucaryote (EM) sont LcrV, YopB, YopD chez *Yersinia spp.*, et EspB, D chez *E. coli*. Chez le pathogène des plantes, *P. syringae*, HrpZ est supposée être la protéine translocatrice. Les protéines dont la structure a été caractérisée sont représentées de façon schématique. OM, membrane externe de la bactérie ; PL, peptidoglycane; IM, membrane interne de la bactérie ; EM, membrane eucaryote ; CW, paroi cellulaire de la cellule végétale. (Tampakaki, 2004).

---

## **Chapitre 2 : Le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa***

Le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* a été découvert en 1996 (Yahr *et al.*, 1996). Il induit une mort cellulaire de type nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Sur les cellules épithéliales, le SSTT provoque une oncose par une déstructuration du cytosquelette. Lors d'une infection pulmonaire, notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose, le SSTT joue un rôle prépondérant dans la phase initiale de colonisation et probablement dans la progression de l'infection (Corech *et al.*, 2005; Dacheux *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2004).

### **1. L'organisation génétique**

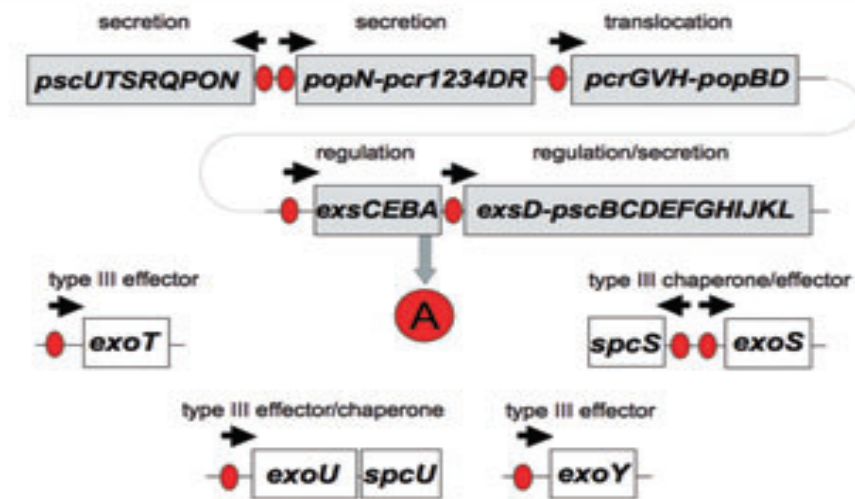
Au sein du « Locus de type III » situé sur le chromosome, 36 gènes regroupés en 5 opérons (figure 12) : *pscNOPQRSTU*, *popNpcr1234DR*, *exsCEBA*, *pcrGVHpopBD* et *exsDpscBCDEFGHIJKL* codent respectivement pour les protéines de l'appareil de sécrétion, les protéines de l'appareil de translocation et les protéines de régulation (le gène *exsD* qui code pour une protéine de régulation se trouve en dehors de l'opéron des gènes de régulation). Six autres gènes codent pour les effecteurs (ExoU, ExoS, ExoY, et ExoT) et leurs chaperonnes (SpcU et SpcS) et sont localisés à des sites éloignés les uns des autres sur le chromosome de la bactérie (figure 11), (Frank, 1997; Yahr and Wolfgang, 2006). L'opéron *exsCEBA* joue un rôle important dans la régulation. La protéine *exsA* est un régulateur transcriptionnel de tous les gènes du SSTT (Dasgupta *et al.*, 2004; Hovey and Frank, 1995; Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005). L'opéron *pcrGVHpopBD* code pour l'appareil de translocation. Les trois opérons qui restent, codent l'appareil de sécrétion.

### **2. Les deux parties du SSTT**

Le SSTT se compose de deux parties (figure 13) : la machinerie de sécrétion de type III, appelée aussi l'injectisome et le translocon.

#### **2. 1. L'injectisome**

La machinerie de sécrétion de type III, appelée aussi injectisome ou secréton de type III a été identifié pour la première fois chez *S. typhimurium* (Kubori, *et al.*, 1998). Suite à



**Figure 12 : Organisation génétique du SSTT de *P. aeruginosa*.** 5 opérons situés de manière contiguë sur le chromosome codent pour les protéines de sécrétion, translocation et de régulation (rectangles gris). Les gènes codent pour les effecteurs (ExoU, ExoS, ExoY, et ExoT) et leurs chaperonnes (SpcU et SpcS) sont localisés à des sites éloignés les uns des autres sur le chromosome (rectangles blanc). ExsA est l'activateur transcriptionnel de tous les gènes du SSTT (site de fixation en rouge). Les flèches représentent les promoteurs dépendants d'ExsA. (Yahr and Wolfgang, 2006).

cette découverte, l'injectisome de plusieurs espèces a été visualisé par microscopie électronique à transmission. Les protéines structurales de l'injectisome sont conservées entre les différents SSTT, avec notamment des similarités de séquence importantes (Cornelis, 2006; Morita-Ishihara *et al.*, 2006; Sekiya *et al.*, 2001; Tampakaki *et al.*, 2004; Troisfontaines and Cornelis, 2005). Ces protéines présentent également des similarités avec les protéines du flagelle (figure 11) (Blocker *et al.*, 2003). L'injectisome est constitué de plus de 25 protéines. Il a été décrit comme un objet cylindrique et symétrique composé de deux parties principales : le corps basal ou sécréton et l'aiguille de sécrétion (figure 13).

### 2. 1. 1. Le corps basal

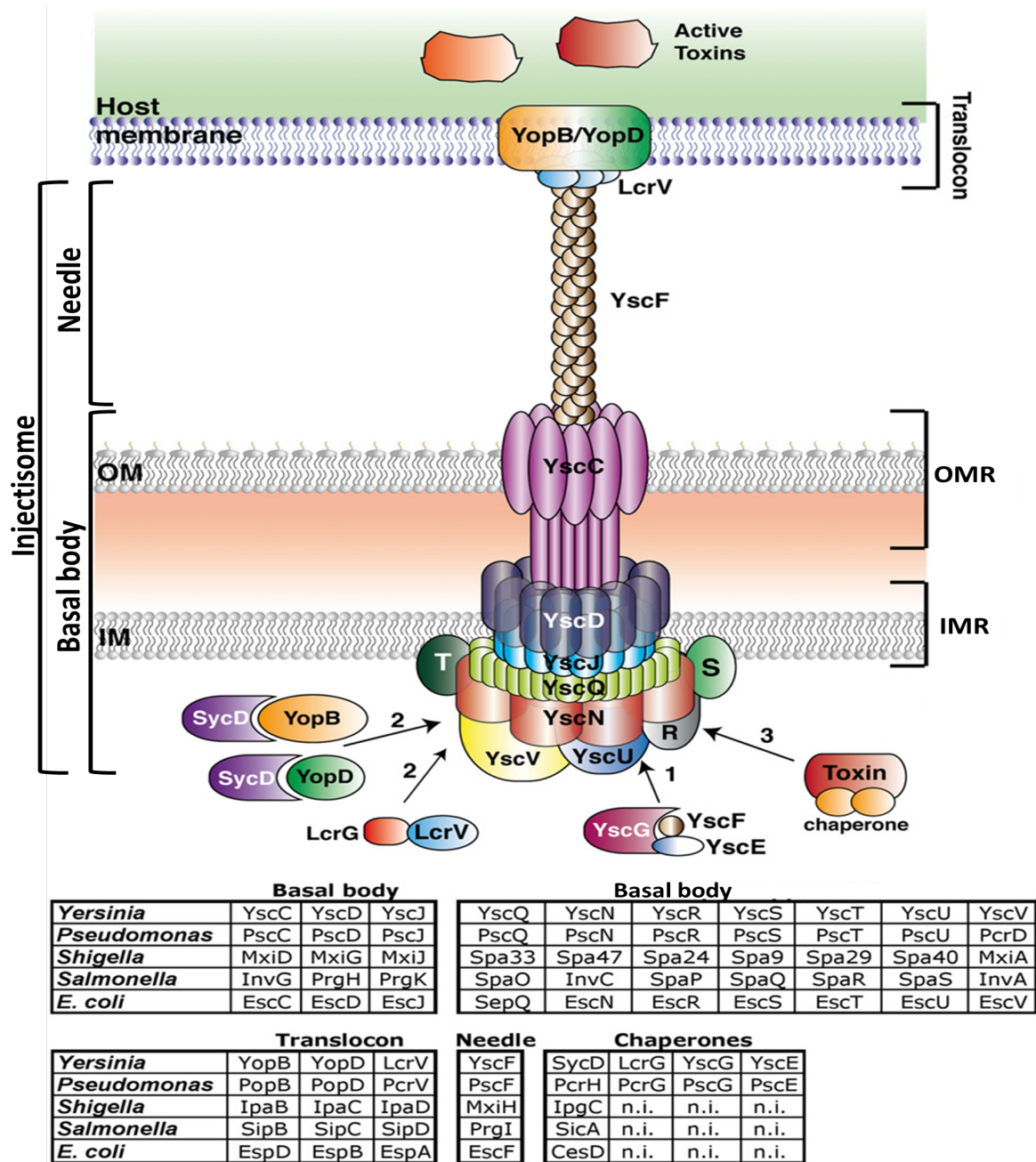
En forme de cylindre et similaire au corps basal du flagelle, il a été bien étudié chez *S. enterica*, *S. flexneri*, *Yersinia spp.*, et *E. coli* entéropathogène (ECEP) (Blocker *et al.*, 2001; Marlovits *et al.*, 2004; Spreter *et al.*, 2009). La comparaison des séquences protéiques a révélé des similitudes permettant de proposer un modèle chez *P. aeruginosa*. Le corps basal des trois espèces *S. enterica*, *Yersinia spp.*, et *E. coli* est un complexe macromoléculaire composé de différents anneaux interconnectés et qui traversent les membranes bactériennes interne et externe ainsi que le peptidoglycane. Trois protéines conservées, membres des familles de

protéines EscJ/PrgK/YscJ (membrane interne), EscD/InvG/YscD (membranaire interne, bitopique) et EscC/InvG/YscC (sécrétine, membrane externe) forment principalement ces structures. Chacune de ces protéines forme un anneau homo-oligomérique composé de 12 à 24 sous-unités et dont le diamètre varie de 110 à 170 Å (Hodgkinson *et al.*, 2009; Schraidt *et al.*, 2010; Spreter *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa* (Hauser, 2009), PscC, la « sécrétine», serait capable d'oligomériser avec l'aide d'une lipoprotéine PscW. Ceci pour former un canal traversant la membrane externe et servirait d'ancrage à l'aiguille de sécrétion (Burghout *et al.*, 2004a; Burghout *et al.*, 2004b; Koster *et al.*, 1997). PscJ est prédite comme étant une lipoprotéine.

La protéine PscN est une ATPase. Elle présente des similitudes avec l'ATPase F0F1 (Woestyn *et al.*, 1994). Elle serait associée à la face cytoplasmique du corps basal et fournirait l'énergie nécessaire à ce système de sécrétion (Blaylock *et al.*, 2006). Il semble que cette ATPase catalyse la dissociation du complexe chaperonne/exotoxine permettant à cette dernière d'être sécrétée (Galan and Wolf-Watz, 2006). Elle serait également impliquée dans la reconnaissance des substrats via un motif signal de sécrétion universel à tous les SSTT, permettant une hiérarchisation de la sécrétion (Akeda and Galan, 2005; Anderson *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 2001). D'autre part, l'activité de PscN serait régulée par la protéine PscL (Blaylock *et al.*, 2006). L'assemblage du sécréton ne nécessite pas un injectisome fonctionnel (Kubori *et al.*, 2000; Marlovits *et al.*, 2004). En outre, tous les composants identifiés du ceps basal possèdent un peptide signal spécifique de la voie du transport Sec. Donc, il est proposé que l'assemblage du ceps basal dépend du système d'export Sec (Hauser, 2009; Kubori *et al.*, 2000).

### **2. 1. 2. L'aiguille de sécrétion**

Le corps basal est mis d'abord en place puis l'aiguille de sécrétion est synthétisée (Sukhan *et al.*, 2001). Elle représente un conduit creux au travers duquel, les exotoxines traversent en une seule étape les enveloppes de la bactérie. L'aiguille de sécrétion est composée d'une centaine de sous-unités d'une seule protéine synthétisée dans le cytoplasme et dont la polymérisation est réalisée uniquement après sa sécrétion à la surface (Kubori *et al.*, 2000; Marlovits *et al.*, 2004; Quinaud *et al.*, 2005). La partie C-terminale de cette protéine est très importante pour sa polymérisation afin de former une structure hélicoïdale comme cela a été démontré notamment pour l'aiguille de *S. flexneri* (Cordes *et al.*, 2003; Deane *et al.*, 2006;



**Figure 13 : Représentation schématique du SSTT de *Yersinia enterocolitica* et les protéines homologues chez *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* et *E. Coli*.** Le SSTT est ancré dans les deux membranes de la bactérie grâce au corps basal. Ce dernier se compose de deux anneaux, le premier est ancré dans la membrane interne (IMR : inner membrane ring ) et le deuxième est ancré dans la membrane externe (OMR : outer membrane ring). Après sa synthèse, la protéine de l'aiguille traverse les anneaux (étape 1) et s'autopolymérise à l'extérieur de la bactérie. Par la suite, les protéines du translocon (étape 2) sont secrétées. En fin, les toxines sont injectées dans le cytoplasme de la cellule eucaryote (étape 3). Les tableaux représentent les protéines homologues chez différentes bactéries. n.i. non identifié. (D'après Izoré *et al.*, 2011).

Poyraz *et al.*, 2010; Quinaud *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Dans le cytoplasme, la protéine formant l'aiguille ne doit pas ni s'autopolymériser ni être dégradée (Plé *et al.*, 2010; Quinaud *et al.*, 2005). Ceci est assuré par des chaperonnes qui séquestrent les résidus de la région C-terminale.

Chez *P. aeruginosa*, l'aiguille mesure entre 60 et 80 nm de long et possède un diamètre externe de 8 nm (Pastor *et al.*, 2005; Quinaud, *et al.*, 2005; Soscia *et al.*, 2007). Les protéines effectrices traversent l'aiguille dans un état déplié à cause de la petite taille de son diamètre. La protéine formant l'aiguille est PscF, une protéine de 9 kDa (Pastor *et al.*, 2005) et dont l'équivalent chez *Y. enterocolitica* est la protéine YscF. Ces deux protéines ont été trouvées dans le cytoplasme associées dans un complexe contenant une chaperonne de type III (PscG et YscG) et une autre protéine partenaire (PscE et YscE) (Quinaud *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). La protéine PscF n'interagit pas avec PscE qui semble jouer le rôle de chaperonne de la protéine PscG. Ceci est vrai pour le complexe YscE/YscF/YscG de *Yersinia SPP.*, (Quinaud *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). Un défaut d'interaction entre les deux protéines PscF et PscG abolit la sécrétion de PscF et fait diminuer la cytotoxicité de la bactérie (Plé *et al.*, 2010).

La taille de l'aiguille est fixe chez une espèce bactérienne donnée et varie peu d'une espèce à l'autre (entre 50 et 80 nm). Des études ont montré que la protéine YscP de *Yersinia spp.*, agit comme un régulateur de la longueur de l'aiguille. De manière similaire, la protéine PscP pourrait jouer le même rôle chez *P. aeruginosa* (Cornelis, 2006; Journet *et al.*, 2003; Marlovits *et al.*, 2006).

## 2. 2. Le translocon

Le translocon est un pore protéique membranaire qui permet aux protéines sécrétées par l'aiguille du SSTT de traverser la membrane plasmique des cellules de l'hôte. Comme pour le SSTT de *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, et *Shigella spp.*, le SSTT de *P. aeruginosa* utilise trois protéines pour la translocation : PopB, PopD et PcrV (Dacheux *et al.*, 2001; Sundin *et al.*, 2002). PopB et PopD sont sécrétées par l'aiguille du SSTT. Elles interagissent entre elles et avec la membrane plasmique des cellules de l'hôte pour former le pore de translocation qui est de 2,8 à 6 nm de diamètre (Faudry *et al.*, 2006; Sundin *et al.*, 2002). En effet, les deux protéines PopB et PopD possèdent des domaines hydrophobiques permettant leur insertion dans la membrane des cellules de l'hôte. La protéine PcrV est également sécrétée par l'aiguille. Elle est nécessaire pour la translocation, mais elle ne fait pas partie du pore de

translocation (Holmstrom *et al.*, 2001; Goure *et al.*, 2004). PcrV est située à l'extrémité de l'aiguille (Broz *et al.*, 2007; Gebus *et al.*, 2008). Elle sert de plateforme facilitant l'assemblage du pore dans la membrane des cellules de l'hôte. Elle lie donc l'aiguille au pore de translocation. En outre, elle fait partie du conduit traversé par les protéines à sécréter (Mota, 2006). PcrH est une chaperonne de Classe II du SSTT. Elle se lie aux translocateurs dans le but de bloquer leur oligomérisation prématurée et d'inhiber leur toxicité pour la bactérie (Menard *et al.*, 1994; Neyt and Cornelis, 1999). Les homologues de PcrH chez *S. flexneri* et *S. enterica* sont IpgC et SicA respectivement. Ces deux derniers jouent un rôle important dans la voie de régulation permettant de relier l'activité transcriptionnelle à l'activité de sécrétion du SSTT (Darwin and Miller, 2001; Parsot *et al.*, 2005), alors qu'aucun rôle régulateur n'a été mis en évidence pour PcrH.

Le rôle du translocon ne peut pas se limiter au transport des effecteurs du SSTT. En effet, le pore de translocation est capable de causer la mort des cellules de l'hôte (Dacheux *et al.*, 2001; Goure *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2005). Ceci en perturbant directement la perméabilité membranaire (Dacheux *et al.*, 2001; Goure *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Shafikhani *et al.*, 2008) ou indirectement en induisant les réponses immunitaires de l'hôte (Roy *et al.*, 2004).

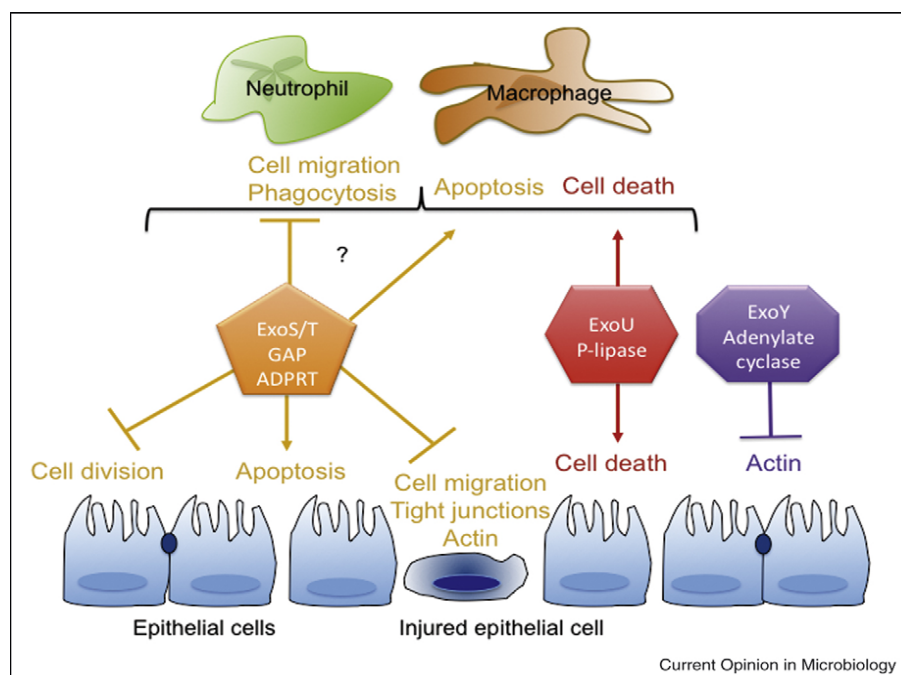
### 3. Les effecteurs du SSTT

Quatre exotoxines (effecteurs) sont sécrétées par le SSTT de *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. Ces effecteurs requièrent un co-facteur eucaryote pour être actifs (Engel and Balachandran, 2009).

La présence de ces effecteurs varie selon les souches. Il semble également que la prévalence de chaque toxine dépend de l'origine des souches (environnement, isolats cliniques de différentes parties du corps) (Feltman *et al.*, 2001). En général, toutes les souches possèdent *exoT*. *exoY* et *exoS* sont présents respectivement dans 89% et 72% des souches. Malgré une forte présence du gène *exoY*, toutes les souches ne produisent pas une exotoxine ExoY fonctionnelle à cause de la présence de mutations qui décalent la phase de lecture (Engel and Balachandran, 2009). La toxine ExoU a une prévalence plus faible, 28% en moyenne, avec de fortes variations. Le gène *exoU* est retrouvé dans 40% des isolats sanguins et de plaies mais dans seulement 10% des isolats respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (Berthelot *et al.*, 2005; Shaver and Hauser, 2004). Les deux gènes *exoU* et

*exoS* sont très rarement retrouvés ensemble dans une même souche (Feltman *et al.*, 2001). En effet, le gène *exoS* serait été excisé lors de la recombinaison qui a permis l'insertion de l'îlot de pathogénicité contenant *exoU* (Kulasekara *et al.*, 2006). La souche de *P. aeruginosa* PAO1 séquencée en 2000 possède *exoT*, *exoS*, *exoY* mais pas *exoU* (www.pseudomonas.com) (Stover *et al.*, 2000).

Les exotoxines délivrées dans le cytoplasme des cellules de l'hôte sont à l'origine de désordres affectant entre autre le cytosquelette et les voies de transduction de signal. Ces exotoxines déclenchent également des processus inflammatoires et apoptotiques aboutissant éventuellement à la mort cellulaire (figure 14) (Engel and Balachandran, 2009; Frank, 1997; Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Yahr *et al.*, 1998).

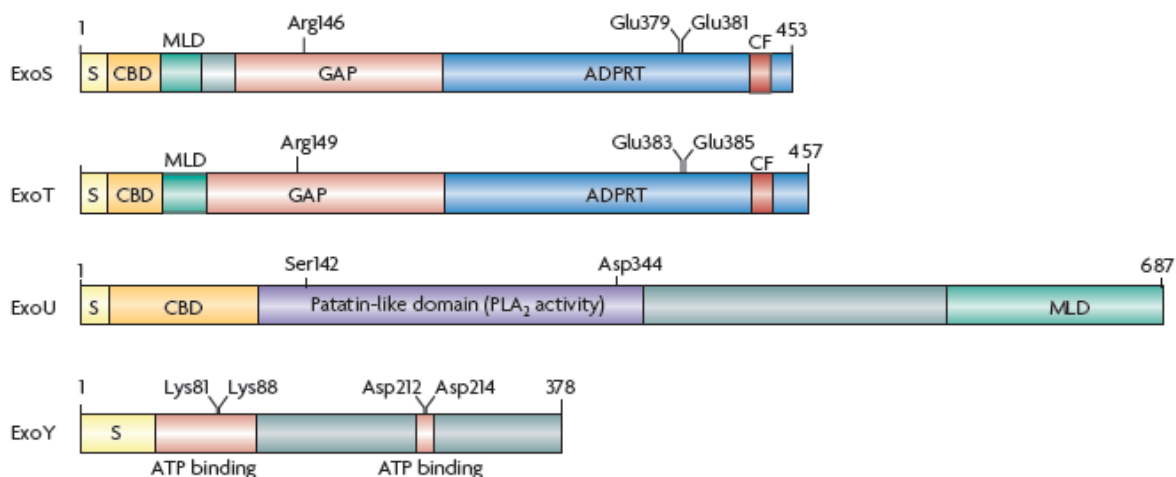


**Figure 14 : Activité des toxines du SSTT.** Les toxines du SSTT de *P. aeruginosa* ont des effets divers et pléiotropes sur les fonctions de la cellule hôte. Les cellules colorées en bleu clair représentent la barrière épithéliale polarisée. La cellule colorée en bleu foncé représente une cellule blessée, cellule dépolarisée de la barrière épithéliale. Un neutrophile est représenté en vert et un macrophage en orange. Les toxines sont représentées par : un pentagone pour ExoS et ExoT, un hexagone pour ExoU et un octogone pour ExoY. Les effets positifs ou négatifs de chacune des toxines sur les processus cellulaires (migration, apoptose, phagocytose, mort, division, migration, jonction et polymérisation de l'actine) sont respectivement indiquées par des flèches ou des lignes barrées, orientées en direction des cellules cibles (D'après Engel and Balachandran, 2009).



### 3. 1. Les exotoxines ExoS et ExoT

Elles correspondent à deux toxines bifonctionnelles avec une homologie de séquence de 76% (Liu *et al.*, 1997). En effet, elles possèdent une activité ADP ribosyltransferase (ADPRT) dans leurs domaines C-terminal et une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho dans leurs domaines N-terminal (figure 15) (Barbieri and Sun, 2004; Goehring *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1997). Le domaine N-terminal de ces deux effecteurs comprend également une séquence nécessaire pour la sécrétion (les 15 premiers acides aminés), une région pour la fixation de la protéine chaperonne et une région hydrophobe pour une localisation intracellulaire après translocation dans les cellules de l'hôte (figure15) (Barbieri and Sun, 2004).



**Figure 15 : Les domaines fonctionnels des exotoxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.** ExoS est une toxine bifonctionnelle de 453 acides aminés. Elle possède une activité GTPase (GAP) et une autre ADP ribosyltransferase (ADPRT). L'Arg 146 est nécessaire pour l'activité GAP et les deux acides aminés Glu379 et Glu381 sont nécessaires pour l'activité ADPRT. Les résidus CF du domaine ADPRT sont nécessaires pour la fixation du cofacteur eucaryote 14-3-3. ExoT est une toxine de 457 acides aminés. L'Arg149 est nécessaire pour l'activité GAP. Les deux résidus Glu383 et Glu385 sont cruciaux pour l'activité ADPRT d'ExoT. Les résidus 422–433 (CF) représentent le site de fixation du cofacteur eucaryote 14-3-3. ExoU est une protéine de 687acides aminés contenant un patatin-like domain nécessaire pour son activité de phospholipase A2. Les résidus Ser142 et Asp344 sont nécessaires pour son activité. ExoY est une adénylate cyclase de 378 acides aminés. Les résidus Lys81, Lys88, Asp212 et Asp214 sont nécessaires pour son activité et pour sa fixation à l'ATP. CBD, chaperone binding domain; CF, cofactor binding site; MLD, membrane localization domain; S, secretion signal. (D'après Hauser, 2009).

Les cibles de l'activité GAP sont les petites protéines G de la famille Rho. Cette activité stimule la réorganisation du cytosquelette d'actine par l'inhibition des protéines Rac et Cdc42. Elle induit la disparition des fibres de tension qui sont constituées d'actine, à travers l'inhibition de Rho (ExoS) et RhoA (ExoT). Ceci inhibe la mobilité et la phagocytose (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2000; Krall *et al.*, 2002; Pederson *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2003; Wurtele *et al.*, 2001).

L'activité ADPRT nécessite une protéine eucaryote soluble appelée FAS (factor activating exoenzyme S) (Coburn *et al.*, 1991). Cette protéine appartient à une famille de protéines hautement conservées : la famille 14-3-3 (Fu *et al.*, 1993; Ganesan *et al.*, 1998; Henriksson *et al.*, 2002). Les cibles de l'activité ADPRT des deux effecteurs ExoS et ExoT sont différents. ExoS agit de préférence sur les protéines de la famille Ras qui sont des protéines des voies de signalisation (Coburn *et al.*, 1989; Fraylick *et al.*, 2002a; Fraylick *et al.*, 2002b; Coburn and Gill, 1991; Henriksson *et al.*, 2002; Iglewski *et al.*, 1978; Knight *et al.*, 1995; McGuffie *et al.*, 1998; Radke *et al.*, 1999). L'inhibition de la voie de signalisation Ras par ExoS perturbe l'adhérence, la prolifération (la synthèse de l'ADN) et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose (Fraylick *et al.*, 2001; Ganesan *et al.*, 1998; Henriksson *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2003). Cette activité enzymatique pourrait être impliquée dans la destruction des jonctions des cellules épithéliales respiratoires, ce qui permet la migration des bactéries vers les vaisseaux sanguins (Soong *et al.*, 2008). Les cibles de l'activité ADPRT de l'exotoxine ExoT sont moins nombreuses. ExoT agit sur les protéines CrkI et CrkII, des phosphoglycérate kinases (Liu *et al.*, 1997; Sun and Barbieri, 2003; Sundin *et al.*, 2001) impliquées dans l'adhésion et la phagocytose (Sun and Barbieri, 2003). En interférant avec leur activité, ExoT inhibe de nombreux processus cellulaires (figure 14) et induit l'apoptose (Garrity-Ryan *et al.*, 2004; Pielage *et al.*, 2008; Shafikhani *et al.*, 2008; Shafikhani and Engel, 2006). L'activité ADPRT d'ExoT ne représente que 0,2 à 1% de celle d'ExoS (Barbieri and Sun, 2004).

### 3. 2. L'exotoxine ExoY

ExoY est une adénylate cyclase (Yahr *et al.*, 1998). Elle possède deux domaines similaires à ceux des adénylates cyclases extracellulaires de *Bordetella pertussis* (CyaA) et *Bacillus anthracis* (EF) (Yahr *et al.*, 1998). Ces deux domaines agissent ensemble pour fixer l'ATP et produire l'AMPc (figure 15). ExoY nécessite un cofacteur des cellules de l'hôte pour

son activité enzymatique, mais ce cofacteur n'a pas encore été identifié (Yahr *et al.*, 1998). L'injection de l'exotoxine ExoY dans les cellules de l'hôte est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui induit l'arrondissement de la cellule (Cowell, 2005; Sayner *et al.*, 2004; Yahr *et al.*, 1998). L'expression des gènes régulés par l'AMPc est perturbée (Ichikawa *et al.*, 2005; Yahr *et al.*, 1998). Ceci aboutit à une désorganisation du cytosquelette d'actine (Vallis *et al.*, 1999; Yahr *et al.*, 1998), inhibition de l'endocytose des bactéries par l'hôte (Cowell *et al.*, 2005) et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Sayner *et al.*, 2004). En effet, ces effets seraient prédits car ils n'ont pas encore été observés (Lee *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2005). Le rôle exact d'ExoY dans la virulence reste inconnu.

### 3. 3. L'exotoxine ExoU

ExoU est la plus cytotoxique des quatre effecteurs du SSTT. C'est une phospholipase A2 très puissante avec un large spectre de substrats (lipides neutres, lysophospholipides et phospholipides) (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Sitkiewicz *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2004). En se basant sur les données concernant les autres effecteurs, le signal de sécrétion de l'exotoxine ExoU semble être dans les 15 premiers acides aminés de la protéine (figure 15). Un domaine pour la fixation de la protéine chaperonne SpcU se trouve entre les résidus 3 à 123. Entre les résidus 107 et 357 se trouve le patatin-like domain qui confère à ExoU l'activité phospholipase A2 (PLA2) (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003). Une fois qu'ExoU est sécrétée dans le cytosol des cellules de l'hôte, elle est ubiquitinylée et rapidement associée à la membrane ce qui lui permet d'être à proximité de ses substrats phospholipidiques (Rabin *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2006). ExoU nécessite un cofacteur eucaryote pour son activité. Ce cofacteur correspond à une superoxyde dismutase (SOD) à  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  dont l'activité enzymatique n'est pas nécessaire à l'activité d'ExoU (Sato *et al.*, 2006). L'injection de l'exotoxine ExoU est à l'origine d'une mort rapide (1 à 2 heures) des cellules de l'hôte. Cette mort est caractérisée par une perte de l'intégrité de la membrane plasmique ce qui est typique des nécroses (Sato *et al.*, 2003). En plus de son activité cytotoxique, ExoU induit l'expression des gènes de l'inflammation (Cuzick *et al.*, 2006; McMorran *et al.*, 2003; Saliba *et al.*, 2005). En outre, cette toxine est capable d'inhiber la voie pro-inflammatoire de la caspase-1 produisant des cytokines (figure 14) (Sutterwala *et al.*, 2007).

#### 4. Les chaperonnes du SSTT

Les protéines sécrétées peuvent être stockées dans le cytoplasme bactérien, ce qui nécessite une association transitoire de ces protéines à des chaperonnes spécifiques. Ceci pour empêcher des interactions intramoléculaires et intermoléculaires précoces ou incorrectes. Ces chaperonnes permettent aux protéines substrats de rester stables, séparées des autres partenaires d'interactions et maintenues dans un état permettant leur sécrétion (Page and Parsot, 2002; Parsot, *et al.*, 2003).

Les chaperonnes spécifiques de la sécrétion de type trois ne présentent pas d'homologie de séquence. Cependant, elles ont des propriétés biochimiques communes : faible poids moléculaire (entre 110 et 160 résidus), Un pI acide (<5) et une présence prédite d'une hélice amphipathique proche du côté C-terminal (Parsot, *et al.*, 2003; Wattiau *et al.*, 1994). Par ailleurs, les gènes codant pour ces chaperonnes sont généralement situés à côté des gènes codant pour leurs substrats. Selon la fonction des molécules substrats, trois classes de chaperonnes ont été distinguées : la classe I des chaperonnes spécifiques des effecteurs; la classe II des chaperonnes spécifiques des translocateurs et la classe III des chaperonnes associées aux autres composants du SSTT (Page and Parsot, 2002; Parsot, *et al.*, 2003; Quinaud *et al.*, 2005; Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2005).

Les chaperonnes spécifiques de la sécrétion de type trois agit comme : i) des facteurs stabilisants et antiagrégants; ii) des signaux de sécrétion permettant une hiérarchie de la sécrétion; iii) des facteurs anti-repliement; iv) des régulateurs du SSTT (Feldman and Cornelis, 2003; Page and Parsot, 2002; Parsot *et al.*, 2003). Chez *P. aeruginosa*, différentes chaperonnes ont été identifiées.

#### 5. Les signaux de sécrétion de type trois

Les effecteurs du SSTT d'une espèce bactérienne peuvent être sécrétés par les SSTTs d'autres bactéries. Ceci indique que tous les SSTTs utilisent un mécanisme commun pour la reconnaissance et la sécrétion des effecteurs (Cornelis, 2003). Il existe trois signaux indépendants et importants pour la sécrétion de type trois (Aldridge and Hughes, 2001).

##### 5. 1. Une séquence de la partie 5' de l'ARNm

Des premiers travaux chez *Yersinia spp.* ont proposé que les protéines Yop possèdent un signal de sécrétion non clivable dans la partie N-terminal. En effet, les premiers 15 et 17

acides aminés sont suffisants pour la sécrétion des protéines YopE et YopH respectivement (Michiels and Cornelis, 1991; Sory *et al.*, 1995). Cependant, il n'existe pas de similarités entre les parties N-terminal des protéines YopE et YopH. De ce fait, Anderson et Schneewind (Anderson and Schneewind, 1997; Anderson and Schneewind, 1999) ont montré que des mutations changeant complètement les 15 premiers acides aminés des protéines YopE et YopN, n'affectent pas la sécrétion (Anderson and Schneewind, 1997). Ils ont remarqué que les signaux de sécrétion du système Ysc/Yop sont les régions 5' des ARNm *yopE* et *yopN* (Anderson and Schneewind, 1997). Les structures prédites de l'ARN des signaux de sécrétion des protéines YopE et YopN ont révélé la présence d'une boucle enterrant le premier codon de début de la traduction AUG dans un duplex (Anderson and Schneewind, 1997). Il est possible que cette boucle soit reconnue par un composant du SSTT (Anderson and Schneewind, 1997). Ce mécanisme de reconnaissance permettant un couplage de la traduction et de la sécrétion est devenu controversé (Cornelis, 2003; Ramamurthi and Schneewind, 2003).

## 5. 2. Une séquence peptidique de la partie N-terminale

Les travaux de Wolf-Watz et ses collègues ont montré que l'altération de la structure de l'ARNm d'YopE par des mutations n'affecte pas la sécrétion (Lloyd *et al.*, 2001). En outre, le remplacement des acides aminés 2 à 8 d'YopE par une séquence de serine ou d'isoleucine a montré que les séquences amphipathiques en N-terminal et non l'ARNm servent comme un signal de sécrétion (Lloyd *et al.*, 2002). Des séquences amphipathiques similaires ont été identifiées pour les effecteurs du SSTT de *P. syringae* (Guttman *et al.*, 2001; Mudgett *et al.*, 2000). Chez *P. aeruginosa*, une séquence signal de 54 acides aminés de la partie N-terminale a été identifiée dans notre laboratoire (Derouazi *et al.*, 2008; Epaulard *et al.*, 2008). Cette séquence est nécessaire pour la sécrétion des deux toxines ExoS et ExoT.

Le signal ARNm pourrait être 'bipartite' et composé d'un signal minimum de sécrétion (codons 1 à 10) ne tolérant pas des mutations ou des substitutions de codons et d'une « région suppresseur » (codons 11 à 15). Cette dernière augmente l'efficacité de la sécrétion et supprime les mutations dans le signal minimum de sécrétion. Cependant, les protéines contenant des motifs Ser/Ile génèrent des séquences amphipathiques qui promeuvent la sécrétion de type trois. Des analyses *in silico* de 58 substrats du SSTT ont révélé que 66% possèdent un signal de sécrétion (Lloyd *et al.*, 2002).

### 5. 3. Le signal chaperonne

En plus du premier signal de sécrétion se trouvant dans les 15 premiers acides aminés de la protéine YopE, un deuxième signal a été localisé, en aval, entre les résidus 15 et 100. Ce dernier est uniquement reconnu par la machinerie de type trois quand il est fixé à sa chaperonne, SycE (Cheng *et al.*, 1997). Le complexe chaperonne/effecteur pourrait fonctionner comme un signal de sécrétion. Il permet une hiérarchie de sécrétion (Birtalan *et al.*, 2002). Cependant, seulement un nombre limité d'effecteurs possède des chaperonnes (Feldman and Cornelis, 2003). Il est possible que d'autres signaux de sécrétion existent.

Bien que l'un de ces signaux soit suffisant pour la sécrétion, la présence des trois peut augmenter la sécrétion. Par ailleurs, la dépendance à un signal ou un autre par le substrat peut rendre la séquence protéique (ou l'ARN) de ce dernier particulièrement plus ou moins sensibles à la mutagenèse (Ramamurthi and Schneewind, 2003). Une hypothèse propose la participation des trois signaux pour une sécrétion efficace (Aldridge and Hughes, 2001; Karlinsey *et al.*, 2000). Le premier signal ARNm *yop* est à l'origine du recrutement des ribosomes. Comme ce signal doit être traduit pour devenir fonctionnel, (Ramamurthi and Schneewind, 2002), le second signal permet l'engagement dans l'appareil de sécrétion du nouveau polypeptide. En fin, la chaperonne du substrat se fixe à sa séquence, en aval, pour prévenir la dislocation d'Yop du canal de sécrétion.



---

### **Chapitre 3 : Régulation du système de sécrétion de type trois**

Ce système d'exportation des protéines jouent un rôle primordial dans l'infection humaine par des bactéries à Gram négatif telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et autres espèces (Coburn *et al.* 2007). Il est devenu une cible pour développer des médicaments anti-infectieux. Néanmoins les SSTTs sont des systèmes très complexes et composés d'un grand nombre de protéines. Il semble que cette arme pourrait aussi poser un problème pour l'agent pathogène lui-même, soit parce qu'elle est métaboliquement très coûteuse ou parce qu'elle peut devenir une cible des défenses de l'hôte. Des études récentes ont révélé que le système immunitaire est capable de détecter la présence du SSTT. Wangdi et ses collaborateurs ont montré que l'infection pulmonaire de souris par une souche de *P. aeruginosa* dont le SSTT est intacte, déclenche une réponse inflammatoire en activant la caspase 1, alors que l'infection par une souche isogénique incapable de transloquer les toxines ne déclenche pas cette réponse (Wangdi *et al.* 2010). Ceci révèle le haut niveau de complexité des programmes d'interactions de l'agent pathogène ou de l'hôte qui ont co-évolués. De plus, la production de l'ensemble des protéines du SSTT est maintenue à un taux très faible. C'est à la suite du contact avec la cellule eucaryote que la sécrétion est activée et l'expression des protéines du SSTT est très rapidement augmentée. Ce phénomène nécessite une régulation génique très sophistiquée qui intègre de nombreux signaux environnementaux ainsi que de nombreux processus cellulaires. Particulièrement, la bactérie doit avoir un programme de régulation affiné qui active son SSTT, à la fois, au bon moment et au bon endroit.

#### **1. Aspects communs de la régulation chez les bactéries pathogènes**

Les bactéries pathogènes occupent différents foyers d'infection. Par exemple, après une invasion réussie, des agents pathogènes d'animaux comme *Shigella spp.* et *Salmonella spp.* ont une vie intracellulaire, tandis que *Yersinia spp.*, *P. aeruginosa* et ECEP restent généralement dans le milieu extracellulaire (Francis *et al.*, 2002; Nataro and Kaper, 1998). Par conséquent, différents stimuli pourraient être utilisés pour réguler l'expression des gènes du SSTT : la température, les cations divalents, le contact avec les cellules de l'hôte, le sérum et d'autres facteurs. La sécrétion est contrôlée à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-



transcriptionnel, traductionnel ainsi que via la commutation conformationnelle et la sécrétion des composants du SSTT (Brutinel and Yahr 2008; Deane *et al.*, 2010).

Stimuli liés au stress, l'environnement et l'hôte	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Yersinia spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i> <sup>b</sup>	ECEP <sup>c</sup>
La température		+	+		+
Les cations divalents	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Le contact cellulaire	+	+	+		+
Le sérum	+	+	+	+	
Le stress et autres facteurs <sup>a</sup>	+	+	+	+	+
Les régulateurs Secrétés	ExsE	LcrQ (YscM)	OspD1		
Le Quorum Sensing	+		+	+	+

**Tableau 3 : Les principaux aspects communs de la régulation des SSTTs de différents pathogènes des animaux.** <sup>a</sup>Voir le text pour plus de détails; <sup>b</sup>*Salmonella spp.*, pathogenicity island I (SPI-1); <sup>c</sup>*E. coli* enteropathogénique.

## 1. 1. Régulation liée à l'hôte et l'environnement

### 1. 1. 1. La température

La plupart des bactéries vivent à l'extérieur de leur hôte. Cependant, suite au contact avec un hôte animal ou humain, la température de croissance de ces bactéries augmente à 37 ° C. Cette augmentation de température induit l'expression des gènes du SSTT (tableau 3) chez *Shigella spp.*, (Maurelli *et al.*, 1984.), *Yersinia spp.*, (Goguen *et al.*, 1984; Michiels *et al.*, 1990) et ECEP (Bustamante *et al.*, 2001; Rosenshine *et al.*, 1996; Umanski *et al.*, 2002). Chez *Shigella spp.*, quand la température augmente à 37 ° C, un activateur transcriptionnel VirF (de type AraC), active VirB qui à son tour active l'expression de l'ensemble des gènes du SSTT (Beloin *et al.*, 2002; Dorman *et al.*, 2001). Comme le surenroulement de l'ADN dépend de la température, la nucléoprotéine H-NS est capable de se lier et de réprimer l'activité du promoteur du gène *VirF* seulement à des températures inférieures à 32 ° C, mais pas à 37 ° C (Falconi *et al.*, 1998). La topologie de l'ADN est impliquée dans la dépendance à la température de l'expression des gènes du SSTT de *Yersinia spp.*, ECEP et *E. coli* entérohémorragique (ECEH) (Cornelis *et al.*, 1991; Rohde *et al.*, 1994; Rohde *et al.*, 1999). Il

est possible que la thermorégulation de ces quatre pathogènes repose sur des bases physiques similaires. Elle implique sans doute l'accessibilité de la nucléoprotéine H-NS à l'ADN cible (Francis *et al.*, 2002). En plus de la température, l'osmolarité, le pH et la tension d'oxygène provoquent des changements topologiques dans la structure locale de l'ADN. Lors de l'infection d'un hôte animal, l'agent pathogène est soumis à l'ensemble de ces stimuli environnementaux (Francis *et al.*, 2002).

### 1. 1. 2. Les cations divalents

Bien que le rôle physiologique des cations divalents n'est pas encore clair, ils peuvent fonctionner comme un signal extracellulaire régulant l'expression des gènes de virulence (Garcia *et al.*, 1996). Chez *S. typhimurium*, un système à deux composantes PhoP/PhoQ détecte la concentration des cations  $Mg^{2+}$  à l'extérieur comme à l'intérieur de la cellule hôte. Ceci afin de réguler inversement deux SSTTs indépendants :

- SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1) : il est important pour assurer l'invasion initiale. Il permet à l'agent pathogène de passer la barrière de la muqueuse intestinale. Il est exprimé dans la lumière du tractus intestinal.
- SPI-2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2) : Il est nécessaire pour la phase d'invasion systémique. Il est exprimé quand les bactéries ont pénétré dans les cellules eucaryotes. Il est très important pour la survie et la prolifération intracellulaire (Chamnongpol *et al.*, 2003; Groisman, 2001).

Chez *Yersinia spp.* et *P. aeruginosa*, l'expression des gènes du SSTT est induite *in vitro* par une déplétion du calcium dans le milieu (Frank, 1997; Goguen *et al.*, 1984; Michiels *et al.*, 1990; Pollack *et al.*, 1986; Yahr and Frank, 1994).

### 1. 1. 3. Le contact Cellulaire

La translocation de type trois est caractérisée par : (i) le contact des cellules bactériennes et eucaryote, (ii) l'introduction des protéines de translocation dans la membrane plasmique eucaryote, et (iii) la formation d'un pore par lequel les effecteurs bactériens sont transloqués (Lee, 1997). Le SSTT et les effecteurs (Yops) chez *Yersinia* représentent un modèle prototype de l'intoxication médiée par ce système (Cornelis and Wolf-Watz, 1997). Le contact des bactéries avec les macrophages active massivement l'expression des gènes des effecteurs Yops ainsi que l'injection de ces effecteurs par le SSTT (Pettersson *et al.*, 1996;

Rosqvist *et al.*, 1994). Des études impliquant l'immunoprécipitation, l'immunofluorescence et la localisation de l'activité enzymatique ont montré que les effecteurs de *Yersinia* (YopE, YopH, YopM et YpkA) sont directement délivrés dans les cellules de l'hôte à partir de bactéries adhérentes (Boland *et al.*, 1996; Hakansson *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1995; Sory and Cornelis, 1994).

L'activation de l'expression des gènes du SSTT par le contact cellulaire est également observée chez *Shigella spp.*, (Ménard *et al.*, 1994; Watarai *et al.*, 1995), ECEP (Rosenshine *et al.*, 1996) et *P. aeruginosa* (Hornef *et al.*, 2000; Vallis *et al.*, 1999).

#### 1. 1. 4. Le sérum

Le sérum est capable d'activer le SSTT de *Shigella* (Ménard *et al.*, 1994), *Salmonella* (Zierler and Galan, 1995), *Yersinia* (Lee *et al.*, 2001) et *P. aeruginosa* (Hornef *et al.*, 2000; Vallis *et al.*, 1999).

#### 1. 1. 5. Autres facteurs

Dans un milieu chimiquement défini comme le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM), le SSTT de *Yersinia spp.*, ne secrète pas, même en présence de faibles concentrations du calcium (Lee *et al.*, 2001). Le glutamate et le sérum de l'hôte doivent être ajoutés dans le milieu chimiquement définis pour activer la sécrétion (Lee *et al.*, 2001).

Chez *Shigella spp.*, des composés chimiques tel que le rouge Congo, le bleu Evans et le direct orange sont capables d'induire la sécrétion des protéines Ipa dans des bactéries en suspension dans le PBS. De plus, l'activation de la sécrétion de la protéine Ipa par le rouge Congo a été observée avec des bactéries en phase exponentielle de croissance, mais pas pour des bactéries en phase stationnaire (Bahrani *et al.*, 1997). L'interaction des bactéries avec des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine ou le collagène de type IV, peut stimuler la sécrétion des effecteurs Ipa (Watarai *et al.*, 1995). Des modifications de l'ARNt sont également nécessaires pour une expression complète des gènes du SSTT (Durand *et al.*, 2000).

Chez *Salmonella spp.*, des études ont montré que :

- Le pH neutre, une faible tension d'oxygène et des conditions de forte osmolarité, favorisent une expression maximale des gènes du SSTT (Bajaj *et al.*, 1996).

- L'augmentation de la concentration d'acétate dans l'iléon distal (intestin grêle) est à l'origine d'un signal stimulant l'expression des gènes du SSTT. Cependant, de fortes concentrations en propionate et butyrate dans le caecum et le côlon (gros intestin) inhibent l'expression des gènes du SSTT (Gantois *et al.*, 2006; Lawhon *et al.*, 2002).
- Des peptides cationiques antimicrobiens qui sont des éléments conservés et très efficaces de l'immunité innée, répriment l'expression des gènes du SSTT. Alors qu'ils activent d'autres régulateurs de virulence (Bader *et al.*, 2003).
- L'expression des gènes du SSTT chez *Salmonella* est réprimée en présence de la bile (Prouty *et al.*, 2004).

Chez ECEP, une sécrétion maximale de type trois est atteinte dans des conditions similaires à celles du tractus gastro-intestinal, y compris la présence du bicarbonate de sodium, des concentrations millimolaires du calcium et du  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  (Kenny *et al.*, 1997). Une régulation négative de l'expression des gènes du SSTT a été observée en présence d'ammonium ou dans le milieu LB (Bustamante *et al.*, 2001). D'autre part, les différents pH rencontrés par la bactérie pendant son passage, de l'estomac à l'intestin grêle, déterminent si l'expression des gènes du SSTT est nécessaire ou non (Shin *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2002).

## 2. Les signaux métaboliques et de stress

Un très grand nombre de signaux métaboliques et de stress régulent l'expression des gènes du SSTT. Ce dernier est souvent lié à l'état métabolique de la bactérie. Chez *Shigella spp.*, certains métabolites intermédiaires impliqués dans la régulation du SSTT ont été identifiés. Parmi lesquels, le quinolinate est un intermédiaire dans la biosynthèse du NAD. Il inhibe l'invasion dépendante du SSTT (Prunier *et al.*, 2007). L'ornithine et autres acides aminés régulent également l'expression des gènes du SSTT (Durand and Björk, 2009). Le mécanisme par lequel des voies métaboliques influencent l'expression des gènes de virulence n'est pas encore clair. L'exemple de *P. aeruginosa* détaillé ci-dessous pourrait apporter des progrès dans ce domaine.

## 3. Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication intercellulaire. Il consiste à produire, libérer, détecter et répondre à des petites molécules de type hormonal (autoinducers). Ces molécules permettent aux bactéries de surveiller leur environnement, et de

modifier leur comportement de façon dépendante de la densité de la population. Ceci en réponse aux changements du nombre et/ou des espèces présentes dans cette population (Waters and Bassler, 2005).

Chez *Y. enterocolitica*, la production des protéines Yop par la souche sauvage ou par un mutant du QS est indiscernable (Throup *et al.*, 1995).

Chez *S. flexneri*, l'expression maximale des gènes du SSTT ainsi que l'activité maximale de sécrétion ont été observés à haute densité cellulaire. Cependant, l'autoinducteur-2 (AI-2), une molécule du QS, active chez *S. flexneri* en fin de la phase exponentielle de croissance, n'a pas d'influence sur l'expression des gènes du SSTT (Day and Maurelli, 2001).

Chez ECEP, le QS contrôle la transcription des gènes du SSTT et la sécrétion des protéines (Sperandio *et al.*, 1999). Les régulateurs connus comprennent AI-2 et AI-3 (Kendall *et al.*, 2007; Sperandio *et al.*, 2003); SdiA, un homologue des régulateurs du QS chez *E. coli* (Kanamaru *et al.*, 2000), et QseA pour quorum-sensing *E. coli* regulator A (Sperandio *et al.*, 2002). QseA partage des homologies avec plusieurs protéines hypothétiques de *P. aeruginosa* et PtxR, qui régule positivement la production de l'exotoxine A (Hamood *et al.*, 1996). Chez *P. aeruginosa*, le QS a un impact important sur l'expression du SSTT, comme décrit ci-dessous.

#### **4. Le contact cellulaire et le couplage sécrétion/activation : les régulateurs sécrétés**

Les SSTTs sont activés par le contact avec les cellules de l'hôte. Une des voies impliquées dans cette activation permet de coupler la sécrétion à l'activation de l'expression des gènes. Ce couplage existe principalement dans toutes les bactéries à Gram négatif utilisant le SSTT comme un facteur de virulence. Cette voie implique généralement un régulateur transcriptionnel du type AraC/XylS, dont l'activité est inhibée par un ligand protéique dépendant de l'état de sécrétion des bactéries.

Le principe des régulateurs sécrétés est originaire de la régulation de la biosynthèse du flagelle. En effet, l'expression des gènes tardifs de la biosynthèse du flagelle est réprimée par FlgM, un anti-facteur sigma, qui se lie au facteur sigma spécifique de la biosynthèse du flagelle, sigma 28. Une fois le corps basal et le crochet du flagelle synthétisés, l'anti-facteur sigma est sécrété par l'intermédiaire du flagelle, libérant ainsi le facteur sigma 28. Ce dernier régule la transcription des gènes tardifs de la biosynthèse du flagelle (Chilcott and Hughes, 2000).

Chez *Yersinia spp.*, la répression de l'expression des gènes du SSTT est bloquée quand LcrQ de *Yersinia pseudotuberculosis*, et deux de ses homologues, YscM1 et YscM2 chez *Yersinia enterocolitica*, sont sécrétés par le SSTT (Cambronne *et al.*, 2000; Cambronne *et al.*, 2004; Pettersson *et al.*, 1996, Stainier *et al.*, 1997; Wulff-Strobel *et al.*, 2002).

Chez *Shigella spp.*, l'expression des effecteurs tardifs de type trois est contrôlée par MxiE et IpgC. Elle est initiée après la sécrétion d'OspD, un anti-activateur de MxiE (Parsot *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, l'expression des gènes du SSTT est activée lorsque ExsE, un petit inhibiteur du SSTT, est sécrétée par le canal ouvert du SSTT (Rietsch *et al.*, 2005, Urbanowski *et al.*, 2005).

L'expression des gènes du SSTT est contrôlée par des réseaux de régulation renfermant plusieurs composants. Ces réseaux intègrent un ensemble diversifié de signaux environnementaux, probablement, pour limiter l'énergie consommée pour la synthèse de plus de 30 protéines (Hueck, 1998). Le couplage sécrétion/activation, les signaux provenant de l'hôte, l'état métabolique et le QS seront détaillés pour *P. aeruginosa*.

## 5. Les activateurs transcriptionnels de type AraC

Les régulateurs transcriptionnels de la famille AraC possèdent en commun un domaine de fixation à l'ADN. Ce domaine d'environ 100 acides aminés est composé de deux motifs de fixation à l'ADN « Hélice-Tour-Hélice » (HTH) (Egan, 2002; Gallegos *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2008). Ces protéines régulent différents processus bactériens tel que le catabolisme des glucides, la réponse au stress et la virulence (Gallegos *et al.*, 1997; Martin and Rosner, 2001).

Chez *Yersinia*, VirF de *Y. enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1987) et LcrF de *Y. pestis* (Yother *et al.*, 1986) et *Y. pseudotuberculosis* (Forsberg and Wolf-Watz, 1988) appartiennent à la famille AraC. VirF est un activateur transcriptionnel clé de l'expression des gènes du SSTT comme *yop* et *yscA-L*. En effet, VirF se fixe sur les promoteurs de ces gènes (Hueck, 1998). Il est uniquement actif à 37 ° C et son expression est modulée par une protéine de type histone YmoA (*Yersinia modulator A*) (Cornelis *et al.*, 1991).

Chez *S. flexneri*, VirF active la transcription du gène *virB* codant pour un régulateur de type ParB (Adler *et al.*, 1989; Beloin *et al.*, 2002). La protéine VirB active alors la transcription des gènes codant pour les protéines de l'injectisome, les chaperonnes, les

protéines de régulation et la première classe (« early ») des effecteurs (Dorman *et al.*, 2001; Tobe *et al.*, 1993). Les effecteurs ainsi synthétisés vont s'accumuler dans la cellule jusqu'à l'activation de la sécrétion. Suite au contact avec la cellule cible, la sécrétion est activée par MxiE, un régulateur de type AraC. Ceci entraîne la transcription d'une quinzaine de gènes codant pour la deuxième classe (« late ») des effecteurs (Le Gall *et al.*, 2005; Ménard *et al.*, 1994).

Chez *S. typhimurium*, Hild et HilC, deux membres de la famille AraC/XylS, activent indirectement via Hila et directement l'expression des gènes du SSTT (Akbar *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 1999). InvF, le troisième régulateur de type AraC, codé par le premier gène du cluster *invspa*, est nécessaire pour une expression optimale de plusieurs gènes codant pour des protéines sécrétées par le SPI-1 (Darwin and Miller, 1999; Eichelberg and Galan, 1999; Kaniga *et al.*, 1994). RtsA, le quatrième régulateur de type AraC, augmente l'expression des gènes du SSTT en induisant l'expression du gène *hila* (Ellermeier and Schlauch, 2003).

ECEP représente une cause majeure des diarrhées infantiles dans un certain nombre de pays en développement (Nataro and Kaper, 1998). PerA (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Porter *et al.*, 2004) et GadX (Shin *et al.*, 2001) sont deux membres de la famille des régulateurs transcriptionnels bactériens AraC/XylR. Il régule d'une façon coordonnée l'expression des gènes de tolérance à l'acidité et les gènes du SSTT. En effet, pour coloniser ou envahir l'épithélium intestinal, ECEP doit d'abord survivre au cours de son passage dans l'estomac à cause des conditions hostiles d'acidité (Francis *et al.*, 2002). Dans ces conditions, GadX (glutamate décarboxylase) active les gènes *gadAB* responsables de l'acido-tolérance. Afin d'assurer la survie de la bactérie, GadX réprime PerA (plasmid encoded regulator), un activateur de Ler (LEE encoded regulator) nécessaire pour l'expression des gènes du SSTT (Mellies *et al.*, 2006). Une fois dans le duodénum, GadX réprime *gadAB* et active PerA. Ce dernier active l'expression des gènes du SSTT qui sont codés par des îlots de pathogénicité appelés LEE (locus of enterocyte effacement). Ces îlots sont nécessaires pour réussir la colonisation de l'intestin grêle.

Chez *P. aeruginosa*, ExsA est un régulateur de type AraC. Il représente la pièce maîtresse dans la régulation de l'expression des gènes du SSTT. Ceci est discuté en détail ci-après.

---

## 6. Les chaperonnes

Chez *Yersinia spp.*, les deux chaperonnes LcrH et SycH, avec leurs substrats YopD et LcrQ/YscM respectivement, jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes du SSTT (Anderson *et al.*, 2002; Cambronne *et al.*, 2000 ; Cambronne *et al.*, 2004; Wulff-Strobel *et al.*, 2002)

Chez *S. flexneri*, IpgC est la chaperonne des deux effecteurs IpaB et IpaC. Quand IpgC est libéré, après la sécrétion de ses substrats, elle se lie à MxiE. De ce fait, cette dernière se lie à ses cibles sur l'ADN et active l'expression des gènes tardifs du SSTT (Mavris *et al.*, 2002; Parsot *et al.*, 2005).

Chez *S. typhimurium*, SicA est une chaperonne de type III. Elle se lie à InvF et l'active. InvF est un régulateur responsable de la transcription des gènes du SPI-1, un système de sécrétion de type trois de cet organisme (Darwin and Miller, 2001). Ceci implique un modèle dans lequel SicA est liée avant la sécrétion à ses substrats SipB et SipC. Lorsque la sécrétion est déclenchée, SipB et SipC sont transportés hors de la cellule libérant ainsi SicA. Cette dernière se lie à InvF et induit la transcription des gènes du SSTT (Miller, 2002).

Chez *P. aeruginosa*, ExsC est la chaperonne d'ExsE. Cette dernière est un régulateur sécrété, agissant comme un anti-activateur dans la régulation de l'expression des gènes du SSTT (pour plus de détails, voir ci-dessous).

## 7. Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (TCS : Two-component system) représentent un des mécanismes les plus fondamentaux et les plus répandus chez les procaryotes. Ils servent à la perception et la transduction des signaux pour répondre aux changements de l'environnement. Un système à deux composants se compose d'un senseur de type histidine kinase et un régulateur de réponse. La signalisation par ces systèmes commence par l'autophosphorylation du senseur sur un résidu histidine conservé, généralement en réponse à un signal extracellulaire. Ce phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé du régulateur. Cette phosphorylation induit un changement conformationnel du régulateur aboutissant à l'activation d'un domaine associé à l'origine de la réponse (Stock *et al.*, 2000).

Chez *Y. enterocolitica*, YsrS/YsrR (Walker and Miller, 2004), un système à deux composants putatif, est nécessaire pour une expression NaCl-dépendante des gènes du TTSS Ysa. Ce dernier est le deuxième SSTT de *Y. enterocolitica* codée par l'ADN chromosomique.



Ce système a été détecté *in vitro*, quand les cellules ont été cultivées à 26 ° C et à haut concentration de NaCl (Haller *et al.*, 2000).

Chez *S. sonnei*, le système CpxA/CpxR est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du TTSS. Ceci via un processus post-transcriptionnel de VirB, le régulateur maître des gènes du SSTT chez *Shigella spp.* (Mitobe *et al.*, 2005). Un autre système à deux composants, OmpR/EnvZ, semble moduler l'expression des gènes du SSTT en fonction des conditions environnementales (Bernardini *et al.*, 1990).

Chez *S. typhimurium*, le système PhoP/PhoQ (Pegues *et al.*, 1995) réprime la transcription des gènes *prgHIJK* (PhoP-repressed gene). En association avec InvG, ce système est nécessaire pour l'assemblage de l'appareil de type trois (Kubori *et al.*, 2000; Marlovits *et al.*, 2004). En fait, PhoP/PhoQ contrôle indirectement l'expression des gènes *prgHIJK* par la régulation de l'expression de la protéine HilA. Cette protéine est le régulateur maître de l'expression des gènes du SSTT de *Salmonella spp.* (Bajaj *et al.*, 1995; Bajaj *et al.*, 1996; Eichelberg and Galan, 1999; Lostroh and Lee, 2001). BarA/SirA, un autre système à deux composants, active l'expression des gènes du SSTT par l'intermédiaire des deux protéines hilA et hilC (Teplitski *et al.*, 2003).

Chez ECEP, lors de l'activation du système à deux composants EvgS/EvgA, le régulateur EvgA active à la fois l'expression des deux gènes *ydeP* et *ydeO*. Les deux protéines YdeP et YdeO agissent conjointement et répriment directement ou indirectement l'expression des gènes du SSTT (Nadler *et al.*, 2006).

Chez *P. aeruginosa*, plusieurs systèmes à deux composants jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes du SSTT. Pour plus de détails, voir ci-dessous.

## **8. Les composants de l'appareil de sécrétion**

### **L'injectisome**

Chez *Yersinia spp.*, les protéines YopN, TyeA et SycN, ensembles avec YscB et LcrG, peuvent former un bouchon de l'appareil de sécrétion. Ce bouchon bloque la sécrétion des effecteurs Yop *in vitro* en présence du calcium ou *in vivo* avant le contact cellulaire. Dans les mêmes conditions, l'inactivation de l'un des cinq gènes codant pour ces protéines est à l'origine d'une sécrétion incontrôlée (Cheng and Schneewind, 2000; Ferracci *et al.*, 2004; Ferracci *et al.*, 2005; Forsberg *et al.*, 1991; Goss *et al.*, 2004; Iriarte *et al.*, 1998; Matson and Nilles, 2001).

## Le Translocon

Chez *Y. enterocolitica*, l'interaction d'YopD et sa chaperonne LcrH, réprime l'expression des ARNm associés à la sécrétion de type 3 (Anderson *et al.*, 2002). La sécrétion d'YopD supprime cette répression. Par conséquent, la délétion du gène *yopD* est à l'origine d'une expression constitutive (Williams and Straley, 1998).

Chez *P. aeruginosa*, une boucle de régulation négative a été proposée en se basant sur le fait que des mutants dans les composantes de l'appareil de sécrétion (*pscN*, *pscC* ou *pcrD*) ne parviennent pas à accumuler les exotoxines de type trois dans le cytoplasme (Hornef *et al.*, 2000; Vallis *et al.*, 1999; Yahr *et al.*, 1996).

Dans tous ces cas, l'altération de l'expression des gènes du SSTT est probablement due à un défaut structurel de l'appareil du SSTT. Il n'est donc pas approprié de considérer ses composantes en tant que régulateurs.

## 9. Régulation du SSTT de *P. aeruginosa*

Contrairement à *Salmonella* ou *Yersinia spp.*, dont les SSTTs sont codés par des éléments génétiques tels que les îlots de pathogénicité ou des plasmides, l'ensemble des gènes nécessaires au fonctionnement et à la régulation du SSTT de *P. aeruginosa* est situé sur le chromosome.

Cette bactérie est particulièrement riche en gènes codant pour des protéines de régulation. En effet, 8% des gènes sont impliqués dans des processus de régulation (Stover *et al.*, 2000). Les systèmes à deux composants sont fortement présents avec 64 senseurs de type kinases et 72 régulateurs de réponse (Rodrigue *et al.*, 2000). Ces circuits de régulation, qui sont nombreux, permettent à la bactérie de s'adapter via une régulation coordonnée des facteurs de virulence. Cette régulation dépend également du site et du stade de l'infection. Ceci explique le fait que *P. aeruginosa* emploie une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle très sophistiquée de son SSTT. Ce dernier est actif au cours de l'infection aiguë. Il attribue aux bactéries une capacité de dissémination rapide et une résistance aux cellules de l'immunité (Dacheux *et al.*, 1999; Engel and Balachandran 2009; Hauser, 2009). Cependant, il est moins actif au cours de l'infection chronique des patients atteints de mucoviscidose. Il existe une multitude de processus de régulation du SSTT. Cette régulation

prend en compte l'environnement de l'hôte, l'état métabolique de la bactérie et les différents signaux en provenance de l'hôte ou d'autres bactéries. Ceci est résumé dans la figure 17.

Le SSTT de *P. aeruginosa* est induit par au moins trois signaux environnementaux (Frank, 1997; Hornef *et al.*, 2000; Vallis *et al.*, 1999; Yahr and Frank, 1994): i) *in vivo*, par le contact avec les cellules eucaryotes de l'hôte, ii) *in vitro*, par la séquestration ou la disparition du calcium du milieu, et iii) par la présence du sérum (grâce à l'existence de certains facteurs comme l'albumine et la caséine qui induisent la sécrétion de type trois (Kim *et al.*, 2005). Cependant, un sous-ensemble renfermant des composants du SSTT de *P. aeruginosa* codés par l'opéron *exsDPscB-L* et l'activateur transcriptionnel ExsA sont constitutivement exprimés. Ceci indique l'existence d'une hiérarchie d'expression similaire à l'assemblage ordonné de la structure du flagelle (Wolfgang *et al.*, 2003b). Cette hiérarchie pourrait faciliter l'assemblage ultérieur du SSTT pour une sécrétion rapide des protéines pré-synthétisées ou co-traduites sous les conditions d'activation du SSTT. Ce type de régulation est appelé le couplage sécrétion/activation.

## **9. 1. Le couplage sécrétion/activation ExsA dépendent**

### **9. 1. 1. ExsA est le régulateur clef du SSTT de *P. aeruginosa***

ExsA est un régulateur transcriptionnel, membre de la famille AraC/XylS. Il est le régulateur central de l'expression des gènes du SSTT. Il est codé par le dernier gène de l'opéron *exsCEBA* et il contrôle sa propre expression via le promoteur *pexsC*. En alignant dix promoteurs identifiés, qui sont sous le contrôle d'ExsA, Brutinel et ses collègues ont identifié une séquence consensus pour la fixation d'ExsA : tAaAAAnwnMyGrCynnnmYTGAYAk (Brutinel *et al.*, 2008). Cette séquence est composée de trois régions hautement conservées : une région riche en adénine dont le centre se trouve à environ -55 à partir du site d'initiation de la transcription, une séquence GxC autour de la position -44 et une séquence TGxxA proche de la position -35. Ces trois régions sont nécessaires pour la fixation d'ExsA et l'activation du promoteur *pexoT* (Brutinel *et al.*, 2008).

En tant que membre de la famille AraC/XylS, ExsA est composée d'un domaine N-terminal impliqué dans l'auto-association et la fixation du ligand et un domaine C-terminal contenant deux motifs hélice-tour-hélice impliqués dans la fixation à l'ADN. Des études par la technique de retard sur gel (EMSA : electrophoretic mobility shift assays) ont montré qu'ExsA purifié se lie aux promoteurs *pexsC*, *pexsD* et *pexoT* avec des constantes d'équilibre

de l'ordre de 1,4 et 5 nM respectivement (Brutinel *et al.*, 2008). La fixation d'une ou deux molécules d'ExsA a été également observée. La fixation sur le premier site d'interaction est nécessaire pour la fixation au deuxième site. Cependant, la délétion du deuxième site n'a aucun effet sur la fixation au premier site (Brutinel *et al.*, 2008). La fixation au deuxième site dépend des interactions monomère-monomère via l'association des domaines N-terminaux (Brutinel *et al.*, 2009).

### 9. 1. 2 La régulation par ExsA

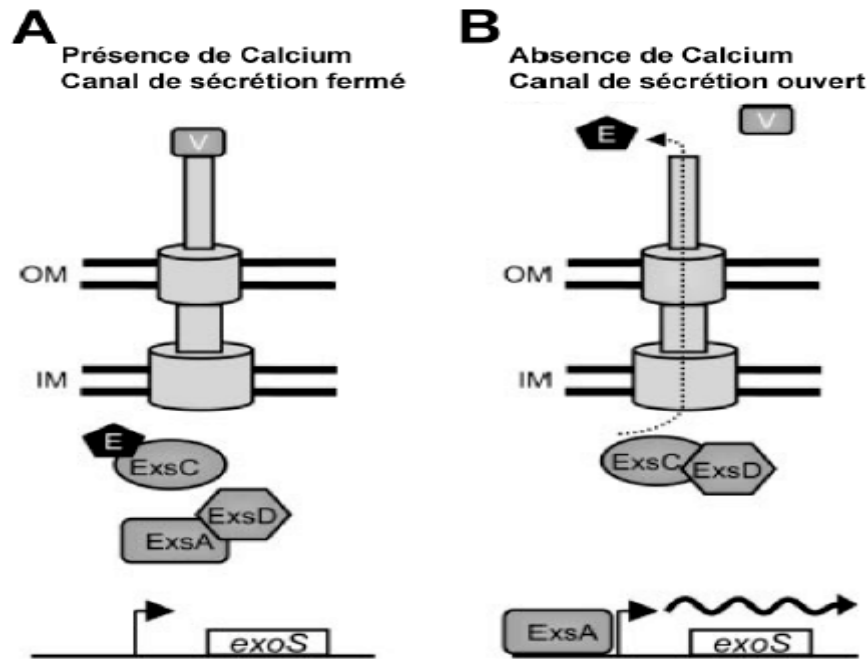
ExsA est très impliqué dans la sécrétion de type trois. Il est activé par le contact cellulaire ou des faibles concentrations du calcium via un changement de partenaires protéiques. Ceci implique l'ensemble des protéines codées par l'opéron *exsCEBA* (figure 16) (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005).

ExsD a été identifié comme le premier répresseur du SSTT de *P. aeruginosa* par McCaw et ses collègues. Ce répresseur interagit directement avec ExsA (McCaw *et al.*, 2002). Il fonctionne comme un anti-activateur. *in vitro* ExsD perturbe l'auto-association et la capacité d'ExsA de se lier à l'ADN (Brutinel *et al.*, 2010). Une surexpression d'ExsD induit une inhibition du SSTT, et son absence une dérégulation de l'opéron *exsCEBA* et par conséquent de l'ensemble des gènes du SSTT (McCaw *et al.*, 2002). Ceci quelles que soient les conditions de culture (avec ou sans activation du SSTT). Cependant, un mutant du gène *exsD* est toujours dépendant du signal d'activation (contact cellulaire ou déplétion calcique) pour sécréter les toxines du SSTT, même si les gènes du système sont dérégulés (McCaw *et al.*, 2002).

ExsC est une chaperonne de la protéine ExsE. Elle agit comme un anti-anti-activateur en se liant et séquestrant l'anti-activateur ExsD. Sous les conditions d'induction du SSTT, ExsC forme un complexe avec ExsD, libérant ainsi ExsA. Ceci permet l'activation de la boucle de rétroaction sur *exsA* et l'augmentation de la transcription des gènes du SSTT (Dasgupta *et al.*, 2004, Lykken *et al.*, 2006, Zheng *et al.*, 2007). Un mutant du gène *exsC* voit la transcription des gènes du SSTT réprimée et une surexpression induit une dérégulation de ces gènes indépendamment de la concentration en calcium (Dasgupta *et al.*, 2004).

ExsE est un régulateur sécrété par le SSTT, *in vitro*, lors d'une déplétion du milieu en calcium. Dans la bactérie ExsE serait lié à sa chaperonne ExsC. Ceci empêche l'interaction entre ExsD et ExsC (Rietsch *et al.*, 2004, Urbanowski *et al.*, 2005). ExsE représente le dernier

partenaire du réseau de régulation du SSTT (figure 16). Cette protéine est positionnée au sommet de la cascade de régulation centrée sur l'activité d'ExsA et sous sa dépendance. En effet, la sécrétion d'ExsE lors de l'activation *in vitro* du SSTT est diminuée d'un facteur 16 en l'absence d'ExsC (Urbanowski *et al.*, 2005).



**Figure 16 : Modèle d'induction *in vitro* du SSTT.** A, en présence de calcium le canal de sécrétion est fermé par PcrV (V), ExsC est séquestrée par ExsE (E) et le gène *exoS* est peu exprimé. B, lors de la déplétion calcique, ExsE est sécrétée libérant ExsC qui séquestre ExsD. ExsA libérée peut alors activer l'expression d'*exoS*. (D'après Rietch *et al.*, 2005).

Le produit supposé du gène *exsB* est homologue à VirB qui est impliqué dans la régulation du SSTT chez *Y. enterocolitica*. Le produit ou l'ARN issu de ce gène est un activateur dans la régulation du SSTT puisqu'une délétion d'*exsB* provoque une diminution d'expression d'*exsA*. Cependant, *exsB* ne semble pas coder une protéine comme l'ont montré les études de Goranson et ses collaborateurs (Goranson *et al.*, 1997). Cette partie de l'opéron *exsCEBA* pourrait jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle d'*exsA* en stabilisant l'ARN.

L'analyse cristallographique du complexe ExsC-ExsE a révélé qu'ExsE est enroulé autour d'une face d'un homodimère d'ExsC (Vogelaar *et al.*, 2010). ExsE contient deux

motifs pour la fixation d'ExsC, qui sont localisés dans les extrémités C-terminale et N-terminale de la molécule. Ces domaines sont composés d'un motif Arg-X-Val-Arg-X qui recouvre partiellement le motif  $\beta$  décrit précédemment chez *Salmonella* par Lilic et ses collègues (Lilic *et al.*, 2006) pour le chaperonne de type trois SipA. Dans le complexe ExsC-ExsE, chaque motif ExsE interagit avec une molécule d'ExsC. Contrairement à ExsE, ExsD possède un seul motif Arg-X-Val-Arg-X et  $\beta$  situés dans la partie N-terminale. Ceci est suffisant pour se lier à ExsC (Vogelaar *et al.*, 2010).

Globalement, dans des conditions non permissives, la transcription ExsA dépendante est inactive car l'équilibre de liaison favorise les complexes inhibiteurs : ExsA-ExsD et ExsC-ExsE. Inversement, les conditions permissives activent la sécrétion d'ExsE, libérant ainsi ExsC qui se lie à ExsD. ExsA est donc libéré pour activer la transcription des gènes du SSTT (figure 16). Selon ce modèle, l'arrêt de la sécrétion pourrait avoir lieu suite à une augmentation de la concentration cytoplasmique d'ExsE qui séquestre ExsD et/ou dissocie le complexe ExsC-ExsD, favorisant ainsi la formation du complexes inhibiteur ExsA-ExsD. Toutefois, ce modèle ne semble pas être possible parce que les molécules d'ExsD libérées de nouveau sont incapables de se lier à ExsA (Brutinel *et al.*, 2010). Bien que les deux protéines soient purifiées sous forme de complexes quand elles sont exprimées chez *E. coli*, elles sont incapables de former un complexe lorsqu'elles sont exprimées et purifiées séparément (Thibault *et al.*, 2009). Comme ExsD a été purifiée sous forme trimérique (Zheng *et al.*, 2007), son domaine de liaison à ExsA pourrait être enfout. Ceci inhibe la formation de nouveaux complexes ExsA-ExsD. Par conséquent, la seule façon d'éteindre le SSTT serait de diminuer la concentration cytosolique d'ExsA, générant ainsi une régulation épigénétique responsable d'une bistabilité (voir plus loin).

Les quatre protéines ExsA, ExsD, ExsC et ExsE forment ainsi une cascade de régulation sous la dépendance d'ExsA. ExsE, au sommet de cette cascade, couple la transcription des gènes du SSTT avec l'activation de la sécrétion. En l'absence d'activation, le canal de sécrétion est fermé, ExsE est fixée à ExsC laissant ExsD jouer son rôle d'inhibiteur en se fixant à ExsA. Lors de l'activation, ExsE est sécrétée, ExsC libérée fixe alors ExsD et permet à ExsA d'induire la transcription des gènes du SSTT. Les évènements permettant la sécrétion d'ExsE lors de l'activation sont encore inconnus.

Cet échange de partenaires nécessiterait une hiérarchie dans les affinités d'interaction des différents complexes : ExsC-ExsE > ExsC-ExsD > ExsD-ExsA. Mesurer la fixation par

titrage calorimétrique et isothermique a révélé un KD de 1 nM pour ExsC-ExsE et 18 nM pour ExsC-ExsD (Lykken *et al.*, 2006, Zheng *et al.*, 2007). Mais curieusement aucune fixation n'a été observée pour le complexe ExsD-ExsA.

Enfin, la structure d'ExsD montre des similitudes frappantes avec le répresseur transcriptionnel KorB. Par la technique de retard sur gel, ExsD n'a pas montré une forte affinité de fixation à l'ADN du promoteur *pexsD*. D'autres études ont montré le contraire. Ceci suggère que la régulation est beaucoup plus complexe (Bernhards *et al.*, 2009).

PtrA (Pseudomonas type III repressor A) peut également réprimer l'expression des gènes du SSTT en se fixant sur ExsA et inhiber sa fonction. Ceci a été mis en évidence par des expériences de double hybride, ELISA et Pull down (Ha *et al.*, 2004). Pour économiser l'énergie liée au SSTT, l'expression de PtrA est fortement induite. Particulièrement, par des concentrations élevées du cuivre comme dans un modèle d'infections de brûlure de peau de souris. Ceci nécessite un système de régulation à deux composants : CopR-CopS. CopR est également le régulateur de la porine OprD. Il interagit avec un autre système à deux composants CzcRS (Caille *et al.*, 2007). Récemment, Elsen et ses collègues ont montré que PtrA est une protéine périplasmique, spécifiquement synthétisée en présence du cuivre. Elle est impliquée dans la tolérance de *P. aeruginosa* au cuivre (Elsen *et al.*, 2011). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour conclure par rapport à un rôle direct ou indirect de PtrA dans la régulation du SSTT.

PsrA est un activateur du SSTT. Il induit l'expression d'ExsA. PsrA interagit probablement avec d'autres partenaires intervenant dans la régulation du SSTT (Kojic and Venturi, 2001; Kojic *et al.*, 2002; Kojic *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2006).

## **9. 2. La régulation ExsA indépendante**

### **9. 2. 1. La régulation épigénétique: bistabilité du SSTT**

Certaines souches sauvages de *P. aeruginosa* sont incapables d'exprimer leur SSTT, sauf quand ExsA est surexprimé en trans (Dacheux *et al.*, 2001). En outre, l'utilisation d'un rapporteur GFP a montré des variations dans l'expression du SSTT allant d'une absence à une surexpression (Hornef *et al.*, 2000). Ces observations, ainsi que la présence d'une boucle de rétroaction positive régulant l'expression d'ExsA, conduit à l'hypothèse évoquant l'existence d'un phénomène épigénétique particulier : une bistabilité entre deux états inductible et non inductible du SSTT de *P. aeruginosa* (Guespin-Michel *et al.*, 2003; Guespin-Michel *et al.*,

2004). Par une approche informatique, un modèle de régulation du SSTT de *P. aeruginosa*, sous conditions d'activation, a été conçu. Il établit une cohérence avec l'hypothèse d'une acquisition épigénétique d'un SSTT inductible. Ce modèle a également montré que seulement une augmentation artificielle (exogène) et transitoire de la concentration d'ExsA serait suffisante pour passer définitivement d'un SSTT non-inductible à un SSTT inductible. Une acquisition stable du phénotype sécrétoire a été démontrée *in vitro* et *in vivo*, après une augmentation transitoire du signal ExsA, ce qui était cohérent avec le modèle conçu (Filopon *et al.*, 2006).

La bistabilité qui semble maintenant être un trait fondamental dans la régulation bactérienne (Dubnau and Losick, 2006; Turner *et al.*, 2009) est épigénétique. En effet, elle n'est pas médiée par des changements génétiques mais la principale source de la bistabilité peut être liée à une transcription au niveau des promoteurs clés. Ceci génère des transitions entre des états alternatifs de l'expression des gènes et une plus grande diversité phénotypique. Ceci est à l'origine d'un meilleur fitness de la population (Mettetal and van Oudenaarden, 2007; Raser and O'Shea, 2005).

### **9. 2. 2. Régulation liée à l'hôte et l'environnement : les systèmes à deux composants et les petits ARNs**

Au cours d'une infection aiguë ou chronique, *P. aeruginosa* utilise différentes voies de régulation à deux composants pour réguler sa virulence ou la formation du biofilm. Les senseurs hybrides RetS et LadS sont impliqués dans la transition entre une infection chronique et une infection aiguë. Ceci d'une manière antagoniste en contrôlant l'expression des gènes de virulence comme ceux du SSTT et les gènes nécessaires pour la formation du biofilm tels que ceux impliqués dans la synthèse des polysaccharides (Laskowski *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2004; Ventre *et al.*, 2006). Ces deux senseurs semblent interagir avec un autre système à deux composants, le système GacS/GacA. GacS est un senseur peu orthodoxe et GacA est un régulateur de réponse. Les signaux détectés par les trois senseurs kinases RetS, LadS et GacS contrôlent hypothétiquement le niveau de deux petits ARN régulateurs.

Suite à la détection d'un signal extracellulaire encore inconnu (identifié comme étant des saccharides chez *P. putida*) (Dubern *et al.*, 2006), le senseur GacS qui est une histidine kinase membranaire s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine (Heeb and Haas, 2001). Le phosphate est ensuite transféré sur GacA, qui devient activé. GacA est impliqué



dans la pathogénie dans de nombreux hôtes (Gooderham and Hancock, 2009). Une fois activée, la protéine GacA est capable de se fixer spécifiquement sur la « GacA box » en amont des gènes *rsmZ* et *rsmY* (Brencic *et al.*, 2009). Les deux petits ARNs RsmZ et RsmY, à leur tour, régulent l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm et le SSTT. Ceci en titrant la quantité des protéines RsmA libres ou actives dans la cellule (Burrowes *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2004; Ventre *et al.*, 2006).

RsmA, «le régulateur des métabolites secondaires», est un régulateur global qui contrôle négativement l'expression de nombreux gènes au niveau post-transcriptionnel. Il régule positivement l'expression des gènes du SSTT (Burrowes *et al.*, 2005; Heurlier *et al.*, 2004; Mulcahy *et al.*, 2006). Plus de 500 gènes sont sous le contrôle de RsmA (Brencic and Lory, 2009). Elle exerce sa régulation négative en se fixant sur une région non traduite (un motif GCA) en 5' des ARNm, empêchant ainsi l'initiation de leur traduction (Lory *et al.*, 2009). RsmA est une protéine qui se fixe sur les petits ARN (Heeb *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2006). Elle pourrait être considérée comme le principal régulateur post-transcriptionnel de *P. aeruginosa*.

RsmA joue un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs gènes de virulence chez *P. aeruginosa* (Burrowes *et al.*, 2005; Heurlier *et al.*, 2004; Pessi *et al.*, 2001). Elle régule positivement l'expression des gènes du SSTT en contrôlant d'autres régulateurs de ce système (Mulcahy *et al.*, 2006). Des mutations du gène *RsmA* sont à l'origine d'une diminution de l'expression de cinq régulateurs positifs du SSTT comprenant RetS, ExsA, ExsC, CyaB et Vfr, et un régulateur négatif, ExsD (Mulcahy *et al.*, 2006). Ces mutations provoquent également une augmentation de la production d'un signal de type quorum sensing, le C4-homosérine lactone (C4-HSL) (Pessi *et al.*, 2001) et l'augmentation de la production de la pompe d'efflux MexEF-OprN qui est impliquée dans des phénomènes de résistance aux antibiotiques (Burrowes *et al.*, 2006). RsmA peut agir positivement sur le SSTT en bloquant la dégradation de l'ARN d'ExsA par une endonucléase négativement contrôlée par RsmA. Tous ces effets, sauf celui exercé sur ExsD, font de RsmA un régulateur positif de l'expression des gènes du SSTT. RsmA est homologue (85% d'identité) à CsrA de *Salmonella* qui est aussi un régulateur positif des gènes d'invasion et des composantes du SSTT de *Salmonella* (Lawhon, *et al.*, 2003).

RetS est un régulateur d'exopolysaccharides et de la sécrétion de type trois (Goodman *et al.*, 2004; Zolfaghar *et al.*, 2005). RtsM est un également régulateur de la sécrétion de type

---

trois (Laskowski *et al.*, 2004). Ils correspondent à la même protéine qui a été identifiée de façon indépendante par deux groupes différents. RetS (RtsM) est une protéine hybride inhabituelle possédant à la fois un domaine senseur avec une activité kinase et deux domaines régulateurs de réponse en tandem. Elle est nécessaire pour l'expression des gènes du SSTT (et aussi le SS TII, la lipase A, l'endotoxine A, le pili de type IV) et pour la répression des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* et les gènes du SSTVI. Un site phosphoaccepteur intact dans le domaine receveur 2, mais pas le domaine receveur 1, est absolument nécessaire pour l'activité de RetS. Cependant, le domaine périplasmique et la phosphorylation du domaine receveur 1 peuvent inhiber l'activation de RetS. Par ailleurs, RetS peut servir de substrat pour un autre senseur à activité kinase (Laskowski and Kazmierczak, 2006). RetS agit d'une manière assez unique en formant des hétérodimères avec GacS, empêchant ainsi l'activation de la voie GacS/GacA (Goodman *et al.*, 2009). LadS est une autre protéine hybride possédant un senseur à activité kinase et un régulateur. LadS avec GacS/ GacA et RetS sont impliqués dans une régulation réciproque de l'expression des gènes du SSTT et la synthèse d'exopolysaccharides (Ventre *et al.*, 2006).

LadS et RetS sont deux senseurs hybrides qui peuvent nécessiter un domaine transmetteur du phosphate appelé Hpt (a histidine phosphotransfer). Parfois, une autre protéine assure ce transfert de phosphate du senseur au régulateur de réponse. Cette protéine est appelée : Histidine phosphotransfer (Hpt) protein. Chez *P. aeruginosa*, seulement trois gènes codant des protéines Hpt ont été identifiés : *hptA*, *hptB* et *hptC*. Dans une étude récente, un mutant *hptB* avait un phénotype similaire à celui d'un mutant *retS*. Malgré ces similitudes, les voies HptB et RetS sont différentes. Les deux voies se croisent au niveau du régulateur de réponse GacA. Mais la signalisation médiée par HptB contrôle l'expression de seulement *rsmY*, alors que la signalisation médiée par RetS module l'expression des deux gènes *rsmY* et *rsmZ*. La signalisation médiée par HptB est une cascade de régulation complexe qui implique un régulateur de réponse contenant un domaine appartenant à la famille de la phosphatase 2C et probablement un facteur anti-anti- $\sigma$  (Bordi *et al.*, 2010). Ce dernier travail a révélé que plusieurs voies de signalisation, qui n'ont pas encore été complètement caractérisées, peuvent intégrer la voie du système Gac. L'effet final est ajusté par un contrôle différentiel des gènes *rsmY* et *rsmZ*. Cela a quelques conséquences pour affiner la régulation des différents facteurs de virulence, comme le contrôle RetS dépendant et HptB indépendante du SSTVI. Il existe d'autres riborégulateurs comme les régulateurs globaux MvaU et MvaT. MvaU et MvaT sont

des régulateurs transcriptionnels de type H-NS. Ils sont capables de former des structures complexes intra ou inter-moléculaires avec l'ADN et inhiber la transcription des gènes cibles en bloquant l'accès de l'ARN polymérase (Dame *et al.*, 2005; Dorman, 2007). Chez *P. aeruginosa*, MvaT et MvaU sont impliqués dans la régulation de l'expression de plus de 150 gènes dont la majorité codent pour des protéines de surfaces, les gènes du QS, le SSTVI, *cupA* (biofilm) et *exxA* (Castang *et al.*, 2008). Les deux protéines MvaT et MvaU se fixent sur une séquence d'ADN riche en Adénine et Thymine située en amont du riboregulateur *rsmZ*.

Ce système complexe, qui comprend différentes molécules senseurs agissant sur différents riborégulateurs, devrait permettre à *P. aeruginosa* de basculer entre des modes d'expression des gènes caractérisant une infection aiguë ou une colonisation chronique (Brencic *et al.*, 2009). Cependant, les signaux captés par ce système ainsi que les relations biochimiques entre les différents régulateurs restent essentiellement non caractérisés. RetS et LadS possèdent 8 segments transmembranaires dont le premier et le deuxième sont reliés par un domaine périplasmique 7TMR-DISMED2 (7 TransMembrane Receptors with Diverse Intracellular Signalling Modules) qui serait capable de détecter des carbohydrates de l'hôte ou de la bactérie (Filloux and Ventre, 2006). Ce domaine a été identifié dans de nombreuses protéines interagissant avec des carbohydrates (Ventre *et al.*, 2006).

Cependant, l'expression des gènes de virulence peut ne pas être exclusive à une infection aiguë ou chronique. Une sécrétion active des toxines du SSTT pourrait avoir lieu dans des conditions de croissance en biofilm (Mikkelsen *et al.*, 2009). Le système décrit ci-dessus pourrait contribuer à la transition entre les phénotypes aiguës et chroniques. Mais de nombreux autres facteurs sont impliqués dans l'activation ou la répression des SSTTs, tel que l'état métabolique et le stress.

### **9. 2. 3. Effets du métabolisme et du stress**

Beaucoup de signaux métaboliques ou du stress interférant avec les SSTTs ont été découverts.

#### **9. 2. 3. 1. La voie de régulation de l'AMPc et Vfr**

L'AMPc est un messager secondaire impliqué dans de nombreuses voies de transduction du signal chez *P. aeruginosa*. L'AMPc est synthétisé par une adénylate cyclase (CyaB) associée à la membrane. Vfr est un homologue de la protéine CRP d'*E. coli* (cAMP receptor protein). CyaB et Vfr sont nécessaires pour l'expression des gènes du SSTT (Lory *et al.*, 2004;

Smith *et al.*, 2004; Wolfgang *et al.*, 2003b). La modulation de l'AMPc intracellulaire semble être un mécanisme important pour contrôler l'expression du SSTT. Le domaine catalytique de l'enzyme CyaB semble être régulé par du carbone inorganique, tel que les ions bicarbonates (Linder and Schultz, 2003). En détectant les ions  $\text{HCO}_3^-$ , CyaB permet aux bactéries de répondre aux variations de la concentration en carbone inorganique. Ceci en modulant la concentration intracellulaire d'AMPc (Yahr and Wolfgang, 2006). Par ailleurs, des concentrations faibles du  $\text{Ca}^{2+}$  et élevées de NaCl augmentent l'activation de l'AMPc et du SSTT (Rietsch and Mekalanos, 2006). L'AMPc agit comme un régulateur allostérique de la protéine Vfr (Albus *et al.*, 1997; Beatson *et al.*, 2002; Wolfgang *et al.*, 2003b). Cette dernière est un régulateur transcriptionnel qui se lie à une séquence spécifique de régulation située en amont des gènes cibles (*lasR*, *fleQ*, *Rega*, *Toxa*). Mais elle peut également réguler de façon indirecte certains gènes, ce qui pourrait être le cas du SSTT car aucune protéine Vfr liée ou recombinante n'a été détectée (Shen *et al.*, 2006). Cependant, en absence d'ExsD, Vfr n'est plus nécessaire pour l'expression des gènes du SSTT, suggérant que Vfr agit comme un dépresseur d'ExsA contre l'anti-activateur ExsD (Dasgupta *et al.*, 2006). Vfr peut être un régulateur central du SSTT, vers lequel de nombreux signaux convergent en agissant sur la concentration intracellulaire d'AMPc. Certains de ces signaux comme celui impliquant FimL ne sont pas complètement caractérisés. Ce dernier est un homologue du domaine N-terminal du complexe protéique chimiosensoriel ChpA. Il régule l'expression des gènes du SSTT en interférant avec la voie de régulation de Vfr (Whitchurch *et al.*, 2005). Les protéines FimL ont une activité phosphodiesterase qui peut moduler les taux d'AMPc dans *P. aeruginosa* (Inclan *et al.*, 2011). La régulation médiée par Vfr est probablement plus compliquée, car cette protéine possède d'autres régulateurs allostériques (comme le GMPc). En plus, Vfr est un régulateur global de l'expression des facteurs de virulence via des mécanismes différents impliquant ou non l'AMPc (Fuchs *et al.*, 2010). SadARS est un système de régulation à trois composants, composé d'un senseur histidine kinase putatif, SadS, et deux régulateurs de réponse, SadA et SadR. SadARS peut réprimer l'expression des gènes du SSTT en favorisant la formation du biofilm (Kuchma *et al.*, 2005). La présence d'un domaine Glu-Ala-Leu (EAL) dans SadR suggère que cette protéine possède une activité phosphodiesterase dégradant le di-GMPc. Ce dernier pourrait être un autre messenger secondaire (avec l'AMPc et le GMPc) impliqué dans la régulation du SSTT et probablement dans la régulation d'autres facteurs de virulence (Lory *et al.*, 2009).

### 9. 2. 3. 2. L'acétyl-CoA et autres stimuli énergétiques

L'expression des gènes du SSTT pourrait être réprimée par de nombreux stress métaboliques. Un mécanisme partiellement commun semble utiliser l'acétyl-CoA comme une partie du signal. La mutation des gènes *aceA* ou *aceB* codant pour des pyruvate dehydrogenases abolie l'expression du SSTT. Cette enzyme est impliquée dans la production de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate au cours d'une glycolyse aérobie (Dacheux *et al.*, 2002). L'absence du régulateur du transport du glucose *gltR* entraîne également un échec dans l'induction de l'expression du SSTT (Wolfgang *et al.*, 2003b). En revanche, l'inactivation de la citrate synthase (une enzyme du cycle de Krebs impliquée dans le métabolisme de l'acétyl-CoA) est à l'origine d'une activation du SSTT (Rietsch and Mekalanos, 2006). Ce résultat suggère fortement l'existence d'un lien entre la régulation du SSTT et l'acétyl-CoA, comme cela a également été prouvé chez *Yersinia enterocolitica* (Schmid *et al.*, 2009). L'acétyl-CoA est un métabolite essentiel pour la croissance dans des conditions d'aérobiose. Le métabolisme anaérobie de *P. aeruginosa* est également important pour la croissance et la formation du biofilm au cours des infections chroniques (Platt *et al.*, 2008).

### 9. 2. 3. 3. L'anaérobiose

Chez *P. aeruginosa*, en anaérobiose, le régulateur global ANR est le senseur des faibles concentrations en oxygène. Il induit l'expression d'une gamme de gènes cibles, y compris l'induction microaérobie du SSTT via la protéine RsmA (O'Callaghan *et al.*, 2011). Des faibles concentrations en oxygène induisent le SSTT de *P. aeruginosa* par la modulation des petits ARNs *rsmZ* et *rsmY*. Le rôle joué par l'oxyde nitrique a été récemment démontré (Van Alst *et al.*, 2009a; Van Alst *et al.*, 2009b). En effet, l'expression du SSTT est abolie lorsque une mutation affecte l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique qui est la nitrate réductase (NirS). Le métabolisme de l'oxyde nitrique est également lié à l'anaérobiose et sa régulation complexe via le régulateur ANR. La régulation positive de la protéine PsrA, un répresseur de l'expression du SSTT (voir ci-dessous), lors de l'anaérobiose a été récemment démontrée par des analyses transcriptomiques et protéomiques (Trunk *et al.*, 2010).

### 9. 2. 3. 4. Les acides gras à chaînes longues

Une autre voie de régulation, liée au métabolisme énergétique, impliquant les gènes du métabolisme des acides gras à longue chaîne (AGLC) a été décrite (Kang *et al.*, 2008). Cette

voie emploie également le régulateur transcriptionnel PsaA qui est sensible à la concentration des acides gras à chaînes longues. Ceci active ou réprime la transcription de l'opéron *exsCEBA* (Kang *et al.*, 2009). PsaA régule également l'expression de RpoS (Kojic *et al.*, 2002). Malgré que PsaA se fixe sur les promoteurs *exsCEBA* (Shen *et al.*, 2006), *in vitro*, des concentrations élevées de PsaA recombinant sont nécessaires. Par conséquent, il est possible que la voie des acides gras à longue chaîne et PsaA régulent indirectement la protéine RpoS. Cette dernière est également connue pour réguler négativement le SSTT (Hogardt *et al.*, 2004). Une augmentation considérable de la concentration de RpoS pendant la phase stationnaire est liée à l'expression des gènes du quorum sensing connu pour inactiver le SSTT (Bleves *et al.*, 2005; Hogardt *et al.*, 2004). PhrS, récemment identifié, est le premier petit ARN montrant un lien de régulation entre la disponibilité en oxygène et le réseau de régulation interférant avec l'expression du SSTT (Sonnleitner and Haas, 2011). Le rôle dans la régulation de RpoS, le quorum sensing et la densité cellulaire reste à caractériser.

### 9. 2. 3. 5. Les acides aminés

Lorsque l'histidine est présente dans le milieu, son absorption excessive et sa dégradation grâce à la surexpression des gènes d'utilisation de l'histidine comme *hutT*, altère la capacité d'induire l'expression d'*exoS* et rend la bactérie non cytotoxique (Rietsch *et al.*, 2004). Ce défaut de cytotoxicité est partiellement corrigé par une insertion dans *cbrA*. Ce dernier est un gène codant pour la kinase du senseur du système de régulation à deux composants CbrAB. Ce système est impliqué dans la détection et la réponse à un déséquilibre de la balance carbone/azote. Dans des milieux pauvres en glucose, une absence de calcium n'induit pas l'expression d'*exoS*, mais l'ajout des casamino acides et le glutamate restaure son induction (Rietsch and Mekalanos, 2006).

Le rôle du tryptophane dans la régulation sera détaillé après. Des travaux précédents dans le laboratoire ont montré que cet acide aminé est impliqué dans la répression du SSTT à haute densité cellulaire de la population (Shen *et al.*, 2008).

### 9. 2. 3. 6. Autres signaux métaboliques ou du stress

Un certain nombre d'autres protéines a été impliqué dans la régulation du SSTT, mais les mécanismes de régulation ne sont pas encore connus. Il s'agit notamment d'un transporteur de magnésium, MgtE. Récemment, il a été montré que MgtE inhibe la transcription des gènes

du SSTT en agissant directement ou indirectement sur le système de régulation ExsCEBA. Cependant, des variations du niveau de magnésium exogène ne provoquent pas l'inhibition de l'activité du SSTT (Anderson *et al.*, 2010).

TruA est une enzyme pseudouridinasase nécessaire pour l'expression des gènes du SSTT. La pseudouridination des ARNt est critique pour la traduction des gènes du SSTT ou de leurs régulateurs (Ahn *et al.*, 2004) sans que l'on comprenne pourquoi exactement.

DsbA est une thiol/disulfure oxydoréductase périplasmique. Elle affecte l'expression de multiples facteurs de virulence y compris les gènes du SSTT. Ceci à cause d'un effet non spécifique sur le repliement anormal des protéines qui est provoqué par un manque des ponts disulfure (Ha *et al.*, 2003).

La surexpression des pompes à efflux MexCD-OprJ et MexEF-OprN est associée à une réduction de l'expression des gènes du SSTT. Comme les substrats de ces pompes peuvent appartenir à différentes familles de molécules, il est possible que le signal intracellulaire nécessaire à l'activation de l'expression des gènes du SSTT soit également un substrat de ces pompes (Linares *et al.*, 2005). En recherchant des différences moléculaires entre des souches exprimant un SSTT et d'autre ne l'ayant pas, Jin et ses collègues ont constaté que les gènes *mexS/T*, qui sont des régulateurs des systèmes d'efflux MexEF-OprN, régulent également le SSTT, l'élastase et la pyocyanine. MexS/T d'une souche exprimant un SSTT confère une expression haute du SSTT dans une souche PAO1 (Jin *et al.*, 2011).

Les dommages à l'ADN ont également une influence sur l'activation du SSTT. Wu et Jin ont montré que la protéine PtrB est un répresseur du SSTT. Cette protéine est régulée par une autre, PtrR, en réponse aux dommages à l'ADN induits par la mitomycine (Wu and Jin, 2005). Des travaux internes au laboratoire ont également montré que les dommages à l'ADN, induits par les UV, réduisent l'activation du SSTT d'une manière ExsA dépendante (données non publiées).

Des molécules originaires des cellules de l'hôte pourraient induire le SSTT. C'est le cas de la spermidine, une molécule importante, qui active le SSTT. La mutation du gène *spuE* impliqué dans le captage de la spermidine est à l'origine d'une diminution de l'expression des gènes du SSTT (Zhou *et al.*, 2007).

Tous les signaux décrits ci-dessus appartiennent à la bactérie elle-même. Or, la communication interbactérienne joue également un rôle important dans la régulation des facteurs de virulence.

---

#### 9. 2. 4. La communication interbactérienne : le Quorum Sensing

La synchronisation des comportements individuels semble faciliter l'infection bactérienne en activant ou réprimant les déterminants de la virulence comme le SSTT.

De nombreuses bactéries communiquent entre elles en utilisant des molécules diffusibles, connues comme des autoinducteurs, dans le but de coordonner les activités de la population (de Kievit and Iglewski, 2000; Rumbaugh *et al.*, 2000), c'est le quorum sensing (QS). *P. aeruginosa* possède, au moins, trois principaux systèmes de QS qui interagissent entre eux : les deux systèmes *las* et *rhl* emploient des molécules signal de type homosérine lactone acylés et des molécules de la famille des 2-alkyl-4(1-H)-quinolone (AHQ). LasI est la synthase de l'autoinducteur N-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (3OC<sub>12</sub>-HSL). RhlI synthétise un autoinducteur appelé N-butyryl homosérine lactone (C<sub>4</sub>-HSL). À forte densité cellulaire, 3OC<sub>12</sub>-HSL et C<sub>4</sub>-HSL atteignent un niveau critique et activent leurs régulateurs, qui à leur tour renforcent la transcription de différents gènes de virulence (De Kievit and Iglewski, 2000; Rumbaugh *et al.*, 2000). Dans des mutants du système *rhl*, une augmentation de l'expression des gènes du SSTT et de la sécrétion d'ExoS pendant la phase exponentielle de croissance ont été observées (Bleves *et al.*, 2005; Hogardt *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2008).

Le facteur sigma de la phase stationnaire RpoS et le système Rhl sont régulés d'une façon coordonnée (Latifi *et al.*, 1996; Whiteley *et al.*, 2000). L'expression de la fusion *exoS'-gfp* augmente dans un mutant *rpoS*. Particulièrement, pendant la phase stationnaire, l'expression d'ExoS est régulée négativement par le système du quorum sensing Rhl et par RpoS (Hogardt *et al.*, 2004).

La famille des alkyl hydroxy quinolones (AHQs) comprend plus de 50 composés quinolone. Parmi ces composés, deux agissent comme des signaux du QS : Pseudomonas quinolone signal (PQS; 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) et son précurseur 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) (Fletcher *et al.*, 2007; Pesci *et al.*, 1999). Singh et ses collaborateurs ont démontré un effet du PQS sur la sécrétion des effecteurs de type trois dans des isolats cliniques, isolés d'un patient atteint d'une pneumonie. Ces observations ont été renforcées par une étude *in vitro* montrant la transformation d'un phénotype non sécrétant en un autre, type trois sécrétant (Singh *et al.*, 2010).

L'expression du SSTT dépend de la densité cellulaire. L'expression de l'opéron *exsCEBA* diminue rapidement au cours de la phase stationnaire (Shen *et al.*, 2008). En effet, pendant la phase stationnaire, *P. aeruginosa* sécrète dans le milieu un signal qui réprime



l'expression du SSTT indépendamment du facteur sigma de la phase stationnaire RpoS et des molécules du QS tels que 3OC<sub>12</sub>-HSL, C<sub>4</sub>-HSL et le PQS. Cependant, ce signal répresseur dépendant de la tryptophane synthase TrpA (Shen *et al.*, 2008). Le tryptophane n'est pas la molécule signal, mais il est le précurseur de certaines molécules de signalisation tels que l'acide indole-3-acétique (AIA) (Cohen *et al.*, 2003) dans les bactéries symbiotiques des plantes, la kynurénine (Kurnasov *et al.*, 2003a; Kurnasov *et al.*, 2003b) impliquée dans la régulation immunitaire, l'anthranilate (Chugani and Greenberg, 2010) et le PQS (Farrow and Pesci, 2007). Shen et ses collaborateurs ont montré que l'acide indole-3-acétique (AIA), l'acide 1-naphthalacétique (un composé similaire à l'AIA) et le 3-hydroxykynurénine inhibent l'expression de l'opéron *exsCEBA* à des concentrations millimolaires.

Récemment, Sonnleitner et ses collègues ont décrit le seul petit ARN régulateur PhrS, dont la transcription dépend du régulateur ANR. Ce dernier régule la réponse aux conditions d'oxygène. Lorsque l'oxygène devient limitant au cours de la phase stationnaire ou dans le biofilm, PhrS est fortement transcrit. Ceci est à l'origine d'une augmentation de la traduction de PqsR, un régulateur du PQS (Sonnleitner and Haas, 2011) et probablement de l'APC, comme cela a été démontré chez *Pseudomonas spp.* M18 (Lu *et al.*, 2009). Cette hypothèse doit être vérifiée afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la régulation négative du SSTT au cours de la phase stationnaire de croissance.

La régulation densité cellulaire dépendante du SSTT est donc très complexe. Comme l'oxygène devient limitant au cours de la phase stationnaire et pendant la formation du biofilm, il est possible que ces deux types de régulation sont parallèles. Concernant la compréhension de la formation du biofilm *in vitro*, beaucoup de progrès a été réalisé (Murray *et al.*, 2007).

Il a été proposé que, suite à l'infection des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, les souches de *P. aeruginosa* évoluent pour diminuer l'expression du SSTT (Lee *et al.*, 2005). Des populations passent progressivement d'un phénotype type trois sécrétant à un phénotype non sécrétant (Jain *et al.*, 2004). Cependant, ces observations *in vitro* doivent être compatibles avec le comportement des isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose.

Les bactéries sont donc capables d'intégrer de nombreux signaux provenant d'elles-mêmes et d'autres bactéries mais le dialogue entre les bactéries et l'hôte doit également être pris en considération.

---

### 9. 2. 5. L'immunité de l'hôte

En 2005, Wu et ses collègues ont proposé que le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* pouvait s'adapter à l'hôte en perturbant son système immunitaire et en adaptant un phénotype suffisamment virulent (Wu *et al.*, 2005). La virulence de *P. aeruginosa* est hautement régulée par le système de QS, un système hiérarchique de la régulation des gènes de virulence et, qui dépend de la densité cellulaire (Diggle *et al.*, 2002; Smith and Iglewski, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999).

Le système du QS semble jouer un rôle clé dans la réponse de *P. aeruginosa* à une cytokine de l'hôte, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Cette dernière peut modifier la virulence de *P. aeruginosa* contre les cellules épithéliales. L'effet de l'INF- $\gamma$  est spécifique car d'autres cytokines ne peuvent pas modifier, par exemple, la production de la pyocyanine (Wu *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* se lie spécifiquement à l'INF- $\gamma$  via une porine de la membrane externe OprF (Wu *et al.*, 2005). OprF est donc un senseur du système immunitaire de l'hôte. Il module le QS pour renforcer la virulence. La production des molécules signal de type N-acyl-L-homosérine lactone (AHL) comme le *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3O-C<sub>12</sub>-HSL) et le *N*-butanoyl-L-homosérine lactone (C<sub>4</sub>-HSL) a été réduite et retardée dans un mutant *OprF*. La production des molécules signal autres que les AHL, tel que le PQS a été diminuée, mais son précurseur, le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) est accumulé dans la bactérie. La production de la pyocyanine, l'élastase, la lectine PA-IL et l'exotoxine A est sous le contrôle du réseau du QS. Cette production est altérée dans un mutant *oprF* (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Le rôle d'OprF dans la régulation du SSTT de *P. aeruginosa* fait partie de ce travail.

### 9. 2. 6. L'adaptation à long terme

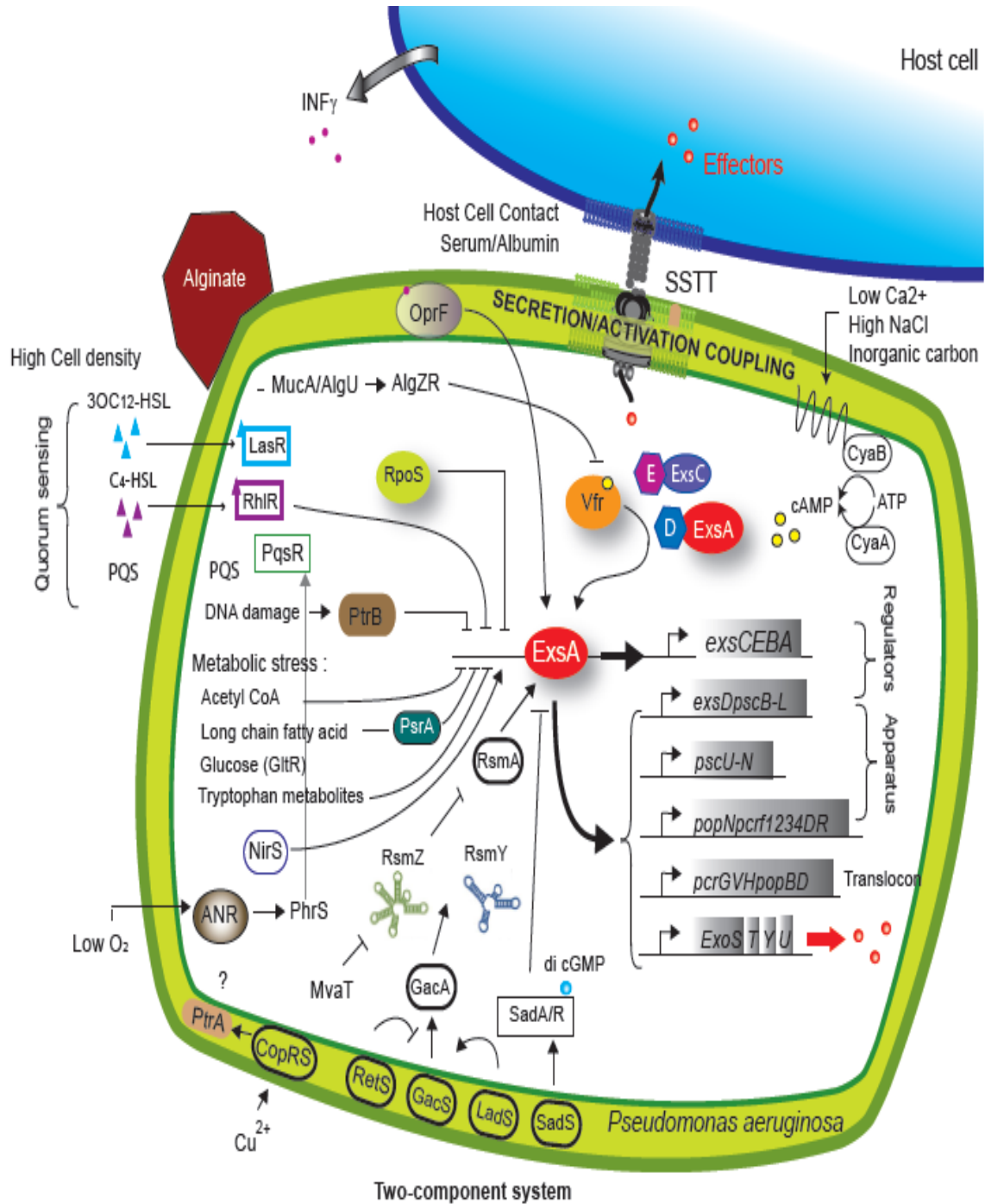
Pendant l'infection des poumons de patients atteints de mucoviscidose, il est bien connu que l'adaptation à long terme de *P. aeruginosa* est due à une sélection de divers génotypes et phénotypes à partir d'un seul clone infectieux. Ce processus est appelé la radiation adaptative (Burns *et al.*, 2001). Au cours de cette microévolution dans les poumons des malades, la virulence des populations de *P. aeruginosa* est modifiée, mais pas réduite. Cette adaptation de la virulence joue un rôle critique dans la pathogenèse des infections chroniques (Bragonzi, *et al.*, 2009). Cette diversité acquise est due à des mutations de perte de fonction affectant des gènes sélectionnés de *P. aeruginosa*. Les mêmes mutations affectant *muca* et *lasR*

déterminent le phénotype mucoïde et la perte du QS (Hogardt and Heesemann, 2010; Winstanley and Fothergill, 2009). Cette adaptation génétique, au cours des infections des poumons mucoviscidiques, est également catalysée par les capacités d'hypermutation à cause de la réparation des mésappariements de l'ADN (Mena *et al.*, 2008).

Le rôle du SSTT au cours des infections des malades atteints de mucoviscidose n'est pas encore bien compris. Cependant, le pourcentage d'isolats SSTT-positifs diminue considérablement avec la durée de l'infection. En effet, il passe de 45% pendant l'enfance à 11% à l'état adulte (Jain *et al.*, 2008). Dans une étude plus ancienne, douze isolats de *P. aeruginosa* ont été incapables de réaliser une sécrétion de type trois. Bien que ces derniers possèdent les gènes du SSTT et l'activateur transcriptionnel ExsA, l'activation de la transcription de l'opéron *exsCEBA* n'a pas été observée (Dacheux *et al.*, 2001). L'expression *en trans* d'ExsA restaure *in vitro* la sécrétion des protéines du SSTT. Ceci indique que l'adaptation de *P. aeruginosa* au sein des poumons des malades atteints de la mucoviscidose pourrait agir sur les circuits de régulation du SSTT.

Une perte de fonction de *mucA* codant pour un facteur anti-sigma, permet l'activation du facteur sigma alternatif AlgU (également appelé AlgT) et la transcription de nombreux gènes, notamment les gènes de synthèse d'alginate (Govan and Deretic, 1996). L'activation du régulon AlgU par la mutation de *mucA* provoque l'inactivation du SSTT en inhibant la voie de signalisation de l'AMPc/Vfr (Jones *et al.*, 2010). Ce travail a montré pour la première fois qu'une seule mutation pourrait inverser la régulation des facteurs de virulence pour une infection aiguë ou chronique.

La sélection des mutations du gène *mucA* est sous la pression du coût énergétique très élevé afin de maintenir un SSTT actif. Ce dernier n'est pas nécessaire pour une croissance en biofilm. En effet, cette adaptation génétique correspond à une stabilisation de la régulation classique (décrite avant), la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle qui est plus rapide mais moins stable. Il a été observé, dans différentes souches de laboratoire de *P. aeruginosa*, que cette adaptation génétique pourrait également induire différents niveaux d'activité de la sécrétion de type trois.



**Figure 17 : Régulation de l'expression du SST de *P. aeruginosa*.** L'expression des opérons codant pour les régulateurs, l'injectisome, le translocon et les effecteurs du SST est sous le contrôle d'un activateur transcriptionnel ExsA. Les principaux autres facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du SST sont indiqués.

Malgré le grand nombre de gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes du SSTT de *P. aeruginosa*, seule une minorité possède un rôle bien précis. C'est le cas du noyau central de la régulation du SSTT de *P. aeruginosa*, qui est composé du régulateur global Vfr, la protéine RsmA, la protéine PsrA qui se fixe au promoteur d'*exsCEBA* et la cascade de régulation ExsADCE. Beaucoup de travaux sont encore nécessaires pour comprendre notamment les bases physiologiques et le fonctionnement de cette régulation extrêmement complexe.

## 10. Objectifs du travail

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* possède un vaste arsenal de facteurs de virulence. Le SSTT est un facteur de virulence majeur et extrêmement performant dont la régulation est complexe pour permettre une adaptation la plus précise possible de la bactérie au cours de l'infection. La compréhension fine des voies de régulation peut déboucher sur la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à modifier l'adaptation de la bactérie à son hôte. Le laboratoire a mis en évidence une nouvelle voie réprimant le SSTT de *P. aeruginosa*. Un signal d'autorépression sécrété est à l'origine de cette répression. Le but de mon travail était donc de comprendre le mécanisme d'action de ce signal puis de caractériser la/les molécules le constituant.

D'autre part, *P. aeruginosa* utilise différentes sources de carbone dont le tryptophane. Cet acide aminé est le précurseur de nombreuses molécules telles que les kynurenines. Ces dernières sont également produites par l'hôte à partir du tryptophane et sont des immunomodulateurs. Peu ou pas d'études ont été réalisées pour mettre en évidence un éventuel rôle d'immunomodulation ou dans la virulence des kynurénines produites par les bactéries. La deuxième partie des travaux de cette thèse a été consacrée à cette nouvelle forme d'adaptation de la bactérie à son hôte.

La porine membranaire OprF représente la protéine la plus abondante de la membrane externe et elle semble jouer un rôle pivot dans l'adaptation de la bactérie en permettant non seulement la régulation de la virulence mais aussi en signalant à la bactérie l'activation du système immunitaire. Donc, OprF représente un candidat intéressant pour le développement d'une thérapie anti *P. aeruginosa* et c'est la raison pour laquelle, nous avons entrepris la production d'anticorps monoclonaux.

*Partie 2 :*  
*Matériel et Méthodes*



## 1. Souches, plasmides et oligonucleotides

### 1. 1. Souches

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont citées dans le tableau 4.

Souches	Génotype et caractéristiques	Source
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\Phi 80dlacZDM15F^- endA1 hsdR17 (r_k^+ m_k^+ supe44 thi-1 \lambda^- recA1 yrA96 relaA1 \Delta (argF-lacZYA) U169$ . Cellules compétentes pour la transformation des plasmides.	Invitrogen
S17-1	$Rp4-2-tc::Mu aph::TN7 recA [SmR]$ Souche donneuse pour conjugaison biparentale.	Simon <i>et al.</i> , 1983
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
CHA	Souche mucoïde isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose	Toussaint <i>et al.</i> , 1993
CHA $\Delta trpA$	CHA contenant une délétion des acides aminés 36-247 du gène <i>trpA</i> .	Shen <i>et al.</i> , 2008
CHA $\Delta kynA$	CHA contenant une délétion des acides aminés 17-270 du gène <i>kynA</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynU$	CHA contenant une délétion des acides aminés 36-346 du gène <i>kynU</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynB$	CHA contenant une délétion des acides aminés 30-184 du gène <i>kynB</i> .	Ce travail
CHA $\Delta phnAB$	CHA contenant une délétion des acides aminés 1-530 et les acides aminés 1-172 des deux gènes <i>phnA</i> et <i>phnB</i> respectivement.	Shen <i>et al.</i> , 2008
CHA $\Delta aroA$	La souche CHA contenant une délétion du gène <i>aroA</i>	Epaulard <i>et al.</i> , 2008
CHA $\Delta kynA \Delta kynU$	CHA contenant une délétion du gène <i>kynA</i> et du gène <i>kynU</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynA \Delta phnAB$	CHA contenant une délétion du gène <i>kynA</i> et de l'opéron <i>phnAB</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynU \Delta phnAB$	CHA contenant une délétion du gène <i>kynU</i> et de l'opéron <i>phnAB</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynA \Delta kynU \Delta phnAB$	CHA contenant une délétion des gènes <i>kynA</i> , <i>kynU</i> et de l'opéron <i>phnAB</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynA$ ( <i>pkynA</i> )	CHA $\Delta kynA$ complétée par le gène <i>kynA</i> .	Ce travail
CHA $\Delta kynU$ ( <i>pkynU</i> )	CHA $\Delta kynU$ complétée par le gène <i>kynU</i> .	Ce travail
CHA( <i>pSlux</i> )	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène <i>exoS</i> ( <i>pS</i> ) et le gène rapporteur <i>lux</i> insérée au site <i>attB</i> dans le chromosome.	Shen <i>et al.</i> , 2008
CHA( <i>pClux</i> )	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène <i>exsA</i> ( <i>pC</i> ) et le gène rapporteur <i>lux</i> insérée au site <i>attB</i> dans le chromosome.	Shen <i>et al.</i> , 2008
CHA( <i>pkynAlux</i> )	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène <i>kynU</i> ( <i>pkynU</i> ) et le gène rapporteur <i>lux</i> insérée au site <i>attB</i> dans le chromosome.	Ce travail

**Tableau 4 : liste des souches utilisées dans cette étude.**



Souches	Génotype et caractéristiques	Source
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
CHA ( <i>pkynUlux</i> )	CHA avec une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène <i>kynU</i> ( <i>pkynU</i> ) et le gène rapporteur <i>lux</i> insérée au site <i>attB</i> dans le chromosome.	Ce travail
CHA ( <i>pphnABlux</i> )	CHA avec une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène <i>phnAB</i> ( <i>pphnAB</i> ) et le gène rapporteur <i>lux</i> insérée au site <i>attB</i> dans le chromosome.	Ce travail
CHA( <i>pSlux</i> )::pexsAind	CHA( <i>pSlux</i> ) transformée par le plasmide pexsAind	Ce travail
CHAp <i>Clux</i> :::pexsAind	CHA( <i>pClux</i> ) transformée par le plasmide pexsAind	Ce travail
PAO1	Souche sauvage de référence.	Stover <i>et al.</i> , 2000
PAO1Δ <i>pqsA</i>	PAO1 contenant une délétion du gène <i>pqsA</i> .	Fletcher <i>et al.</i> , 2007
PAO1Δ <i>kynA</i>	PAO1 contenant une délétion du gène <i>kynA</i> .	Ce travail
MPAO1	Souche sauvage de PAO1	Université de Washington www.gs.washington.edu
PAO1Δ <i>gacA</i> (PW5340)	Le gène <i>gacA</i> est muté par transposition dans la souche MPAO1	Université de Washington www.gs.washington.edu
PAO1Δ <i>gacS</i> (PW2683)	Le gène <i>gacS</i> est muté par transposition dans la souche MPAO1	Université de Washington www.gs.washington.edu
PAO1Δ <i>retS</i> (PW9165)	Le gène <i>retS</i> est muté par transposition dans la souche MPAO1	Université de Washington www.gs.washington.edu
PAO1Δ <i>ladS</i> (PW7726)	Le gène <i>ladS</i> est muté par transposition dans la souche MPAO1	Université de Washington www.gs.washington.edu
H103	La souche sauvage prototrophe PAO1.	Fito-Boncompte <i>et al.</i> , 2011
H636	La souche H103 contenant une délétion du gène <i>oprF</i> .	Fito-Boncompte <i>et al.</i> , 2011
H636O	La souche H636 complétée par le gène <i>oprF</i> .	Fito-Boncompte <i>et al.</i> , 2011
H103(pEAI-S54-GP100)	La souche sauvage prototrophe PAO1 transformée par le plasmide pEAI-S54-GP100.	Ce travail
H636(pEAI-S54-GP100)	La souche H103 contenant une délétion du gène <i>oprF</i> et transformée par le plasmide pEAI-S54-GP100.	Ce travail

Tableau 4 : suite de la liste des souches utilisées dans cette étude.

## 1. 2. Plasmides

Les plasmides utilisés dans ce travail sont cités dans le tableau 5.

Plasmides	Description	Source
pTOPO	Vecteur de clonage, Ap <sup>r</sup>	Invitrogen
pUCP20	Vecteur de clonage. mobilisable dans <i>E.coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> . Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ).	West <i>et al.</i> , 1994
pEX100Tlink	Ap <sup>r</sup> ; pEX100T avec polylinker	Quénée <i>et al.</i> , 2005
pCM157	Tc <sup>r</sup> : séquence codant la recombinaison Cre	Marx and Lidstrom, 2002
pUCGmlox	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , vecteur contenant le gène <i>aacCI</i> flanqué des séquences <i>lox</i>	Quénée <i>et al.</i> , 2005
Mini-CTX- <i>exsC-plux</i>	Contient l'opéron luxCDABE sous le contrôle du promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i>	Laskowski, 2004
Mini-CTX- <i>exoS-plux</i>	Contient l'opéron luxCDABE sous le contrôle du promoteur du gène <i>exoS</i>	Laskowski, 2004
pFLP2	Flp recombinaison; Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> )	Hoang <i>et al.</i> , 1998
<i>pexsA</i> ind (pEAI)	Dérivé de pUCP20. Le gène <i>exsA</i> est sous la dépendance de <i>ptac</i> ; <i>lacIQ</i> . Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ) et séquence de la chaperonne Orf1.	Filopon <i>et al.</i> , 2006
pKO- <i>kynA</i>	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> : clonage dans pEX100Tlink de la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynA</i>	Ce travail
pKO- <i>kynB</i>	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> : clonage dans pEX100Tlink de la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynB</i>	Ce travail
pKO- <i>kynU</i>	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> : clonage dans pEX100Tlink de la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynU</i>	Ce travail
Mini-CTX- <i>pkynA-lux</i>	Contient l'opéron luxCDABE sous le contrôle du promoteur du gène <i>kynA</i>	Ce travail
Mini-CTX- <i>pkynU-lux</i>	Contient l'opéron luxCDABE sous le contrôle du promoteur du gène <i>kynU</i>	Ce travail
Mini-CTX- <i>pphnA-lux</i>	Contient l'opéron luxCDABE sous le contrôle du promoteur du gène <i>phnA</i>	Ce travail
<i>pkynA</i>	Vecteur dérivé du plasmide pUCP20 contenant le cadre de lecture du gène <i>kynA</i> ; Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> )	Ce travail
<i>pkynU</i>	Vecteur dérivé du plasmide pUCP20 contenant le cadre de lecture du gène <i>kynU</i> ; Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> )	Ce travail
pEAI-S54-GP100	Vecteur dérivé du plasmide <i>pexsA</i> ind; fusion transcriptionnelle entre la séquence des 54 premiers acides aminés d'ExoS (exoS54) et la séquence 21-150 de l'antigène GP100.	Derouazi <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 5 : liste des plasmides utilisés dans cette étude.** <sup>a</sup>Apr : ampicillin resistance; Gm<sup>r</sup> : gentamycine resistance; Tc<sup>r</sup> : tetracycline resistance; Cb<sup>r</sup> : carbenicilline resistance; KO : knock out.

### 1. 3. Oligonucleotides

Les oligonucleotides utilisées dans ce travail sont citées dans le tableau 6.

Nom	Sequences*	Description
<i>kynA</i> -U1 <i>kynA</i> -U2	5'-AGAGCTCTGCTCAACGGCGGCGGAAAGCGTT-3' 5'-TAAGCTTCTCTCCGTCGGTTTCTCCCTG-3'	Amplification de la région en amont et flanquante du gène <i>kynA</i>
<i>kynA</i> -D1 <i>kynA</i> -D2	5'-TAAGCTTAGCATGCTCGATACCATCCTC-3' 5'-AGGATCCATCGACCAACGCCTGATCAA-3'	Amplification de la région en aval et flanquante du gène <i>kynA</i>
<i>kynA</i> -1 <i>kynA</i> -2	5'-TACCGTCGCTGCCTACCAGGC-3' 5'-CATGGGGCTTTTGC GGCAAGA-3'	Vérification du mutant $\Delta$ <i>kynA</i>
<i>kynB</i> -U1 <i>kynB</i> -U2	5'-AGAATTCCGCGGAAACATAGGCCTG-3' 5'-TAAGCTTCCTGCTGGAACGGCGTG-3'	Amplification de la région en amont et flanquante du gène <i>kynB</i>
<i>kynB</i> -D1 <i>kynB</i> -D2	5'-TAAGCTTACGAACTACTCGCCCTGCC-3' 5'-ATCTAGAACCCAGCCGACAGCGGTT-3'	Amplification de la région en aval et flanquante du gène <i>kynB</i>
<i>kynB</i> -1 <i>kynB</i> -2	5'-TGCAGGTGACGGAGAATGCG-3' 5'-AGTTGCCGTCGAGGTAGATC-3'	Vérification du mutant $\Delta$ <i>kynB</i>
<i>kynU</i> -U1 <i>kynU</i> -U2	5'-AGAGCTCGATGGCGTCCAGGGACA-3' 5'-TAAGCTTGCCGTCGAGGTAGATCAC-3'	Amplification de la région en amont et flanquante du gène <i>kynU</i>
<i>kynU</i> -D1 <i>kynU</i> -D2	5'-TAAGCTTCGAGCATGCCAGG-3' 5'-ATCTAGAACACCACCAGGCAC-3'	Amplification de la région en aval et flanquante du gène <i>kynU</i>
<i>kynU</i> -1 <i>kynU</i> -2	5'-CGACTGCCTGGCGCTCGA-3' 5'-TTGTGCCGGACCTGGTAGC-3'	Vérification du mutant $\Delta$ <i>kynU</i>
<i>kynA</i> -C1 <i>kynA</i> -C2	5'-TCGAGCTCGTGTCTTGGCCCTCACTCC-3' 5'-GAGGATCCCTACAGGTTGGAACGGAGCC-3'	Amplification du cadre de lecture du gène <i>kynA</i> pour la complémentation
<i>kynU</i> -C1 <i>kynU</i> -C2	5'-ACGAATTCGACCACTCGTGACGACTGC-3' 5'-ACTCTAGATCAGGTCACCTTGTGCCGG-3'	Amplification du cadre de lecture du gène <i>kynU</i> pour la complémentation
<i>pkynA</i> -F <i>pkynA</i> -R	5'-TAAGCTTCGCTGGATGGAGTGG-3' 5'-AAGATCTCTCCGGCGCAGGCGTC-3'	Amplification du fragment contenant le promoteur du gène <i>kynA</i>
<i>pkynU</i> -F <i>pkynU</i> -R	5'-AGAATTCCACCGAGTAGCCGCGG-3' 5'-TGGATCCTTTTCTCCGGAAGTCCAGCG-3'	Amplification du fragment contenant le promoteur du gène <i>kynU</i>
<i>pphnA</i> -F <i>pphnA</i> -R	5'-AGAATTCCGAGTCGGCCTATACCGA-3' 5'-TGGATCCGACTGGCCTGCGCGACG-3'	Amplification du fragment contenant le promoteur de l'opéron <i>phnAB</i>
<i>phzABC</i> -U1 <i>phzABC</i> -U2	5'-AGAATTCATTCCCCGGTAACAAC-3' 5'-TAAGCTTCATTGCCATGTAGCGCTC-3'	Amplification de la région en amont et flanquante de l'opéron <i>phzABC1</i>
<i>phzABC</i> -D1 <i>phzABC</i> -D2	5'-TAAGCTTGAACCCCTGGCAGGCGCT-3' 5'-ATCTAGACCTTCAGCGCCAGCAGC-3'	Amplification de la région en aval et flanquante de l'opéron <i>phzABC1</i>
<i>phzABC</i> -1 <i>phzABC</i> -2	5'-GGCATACTGGAGAGCCCT-3' 5'-GGAATGCCGCTCATGCCAC-3'	Vérification du mutant $\Delta$ <i>phzABC1</i>

**Tableau 6 : liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.** \*Les sites de restrictions sont soulignés.

## 2. Culture bactérienne

### 2. 1. Milieux de culture

- **Luria-Bertani (milieu LB)**

- Tryptone	10,0g
- Extrait de levure	5,0g
- NaCl	10,0g
- Eau qsp	1L

Tamponné à pH 7 et stérilisation par autoclavage. Pour préparer 1L du milieu LB gélosé, il faut ajouter 15g d'agar.

- **Vogel-Bonner (milieu VB) modifié (Vogel and Bonner, 1956)**

- D-(+)-Glucose	4,5 g
- Acide citrique	2,0 g
- $\text{NaNH}_5\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,5 g
- Eau qsp	1 L

Tamponné à pH 7,2 et stérilisation à 0.20 $\mu\text{m}$ .

- ***Pseudomonas* Isolation Agar (milieu PIA)**

- Poudre PIA (Difco laboratories, Detroit, USA)	45,0 g
- Glycérol	20 mL
- Eau qsp	1 L

Stérilisation par autoclavage.

- **Milieu M9 modifié (M9M)**

- Extrait de levure synthétique	4,0 g
- Tryptophane	0,2 g
- Glucose	2,5 g
- Glycérol	10 mL
- $\text{FeSO}_4$	0,4 g
- Acide citrique	2,0g
- Milieu M9 5X (Sigma)	11,3 g
- $\text{MgCl}_2$	0,2 g
- $\text{CaCl}_2$	0,15 g
- Eau qsp	1 L

Tamponné à pH 7,2 et Stérilisation à 0.20 $\mu\text{m}$ .

---

## 2. 2. Antibiotiques utilisés

	<i>E. coli.</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Liquide	Gélose	Liquide	Gélose
Gentamycine	10 µg/mL	10 µg/mL	200 µg/mL	200 à 400 µg/mL
Carbenicilline	–	–	300 µg/mL	300 à 600 µg/mL
Ampicilline	100 µg/mL	100 µg/mL	–	–
Kanamycine	50 µg/mL	50 µg/mL	–	–
Tétracycline <sup>a</sup>	20 µg/mL	20 µg/mL	250 µg/mL	150 à 250 µg/mL

**Tableau 7 : Antibiotiques utilisés.** <sup>a</sup>Les solutions d'antibiotiques sont préparées dans l'eau et stérilisée par filtration à 0,2µm. La solution de la tétracycline est préparées dans l'éthanol absolu.

## 2. 3. Culture de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un pathogène classé P2. Sa manipulation nécessite des règles strictes de confinement; sauf cas d'inoculation massive, sa dangerosité chez le sujet immunocompétent est très réduite.

### La souche de référence du laboratoire : CHA

La souche de *P. aeruginosa* du laboratoire est la souche CHA (Toussaint *et al.*, 1993). Elle a été isolée au CHU de Grenoble, à partir d'un lavage broncho-pulmonaire de patient atteint de mucoviscidose. Cette souche adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire et possède un système de sécrétion de type III actif *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, et *in vitro*, par une déplétion du milieu en calcium ou un contact cellulaire. Elle dispose des gènes codant les exotoxines du SSTT : ExoS, ExoT, ExoY, mais ne possède pas le gène codant ExoU.

Son phénotype de résistance aux antibiotiques est celui d'une souche sauvage, n'ayant pas acquis de modes de résistance supplémentaires : pas de résistance aux carboxypénicillines; pas de résistance aux autres aminosides que la kanamycine et pas de résistance à la tétracycline.

En milieu liquide, *P. aeruginosa* peut être cultivée à 37°C en milieu riche (milieu de Luria Bertani, dit LB) ou en milieu minimal de Vogel Bonner modifié (VB) sous agitation (250 rpm). En milieu solide, on peut la cultiver en milieu LB supplémenté en agar, ou en milieu *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA).

#### **2. 4. Culture d'*Escherichia coli***

*E. coli* est cultivée en milieu LB liquide sous agitation (250 rpm) à 37°C. La croissance en milieu solide gélosé est effectuée sur du LB dans une étuve à 37°C.

#### **2. 5. Suivi de la croissance et densité bactérienne**

La croissance des bactéries est mesurée par la densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) de la culture à l'aide d'un spectrophotoluminomètre (TriStar LB 941, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Germany). Une unité de DO correspond à 8.10<sup>8</sup> bactéries/ml pour *E. coli* et 6.10<sup>8</sup> bactéries/mL pour les souches de *P. aeruginosa* mucoïdes et 5.10<sup>8</sup> bactéries/mL pour les souches non mucoïdes.

#### **2. 6. Conservation des souches**

Les souches d'*E. coli* sont conservées à -80°C dans du milieu de culture additionné de glycérol 40 % (v/v). Les souches de *P. aeruginosa* sont conservées également à - 80°C sur des supports microbilles (tubes PROTECT Bacterial Preservers, Technical service consultant Limited, UK) inoculés à partir de culture sur gélose.

### **3. Techniques de biologie moléculaire**

#### **3. 1. Polymérisation en chaîne (PCR)**

La réaction de PCR s'effectue dans un thermocycleur automatique (Master cycler gradient, eppendorf, Germany) et commence par une dénaturation de la matrice à 95°C pendant 2 à 5 min, suivie de 30 cycles de synthèse et se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Un cycle de synthèse est constitué de trois étapes :

- 1 - Dénaturation de l'ADN double brin, 95 °C de 45 secondes à 5 min
- 2 - Hybridation des amorces sur la matrice à T<sub>m</sub>-4 °C, 45 secondes.

La température d'hybridation ( $T_m$ ) dépend de la richesse en bases C et G des amorces et de leur degré de complémentarité avec la matrice. Elle se calcule selon la formule suivante (basée sur la séquence commune à l'amorce et à la matrice) :  $T_m = 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})$ .

3 - Elongation par l'ADN polymérase à partir des amorces. La durée est dépendante de l'ADN polymérase utilisée et de la longueur de la séquence à amplifier (1 min pour 1 kb)

Le mélange réactionnel est composé de :

- ADN matrice<sup>a</sup> 10 à 100 ng
- Amorce sens 0,3  $\mu\text{M}$
- Amorce anti-sens 0,3  $\mu\text{M}$
- dNTP 0,2 mM de chaque
- Tampon de Polymérase
- Polymérase 2,5 U (Taq) / 1,25 U (Pfu)
- Eau qsp 50  $\mu\text{L}$

Du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 4% et/ou du  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM) peuvent être ajoutés pour optimiser la réaction. <sup>a</sup>Pour la PCR sur colonie bactérienne, on prélève une colonie qui sera suspendue dans 100 mL d'eau stérile. On chauffe la suspension à  $95^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes afin de lyser les cellules. Après une centrifugation à 6000g pendant 5 min, le surnageant est utilisé comme ADN matrice.

Cette amplification est essentiellement utilisée à deux fins : disposer d'une séquence pour un clonage ou détecter un événement : présence d'une séquence, taille d'une séquence (par exemple après une délétion) ...etc.

Pour faciliter les clonages des fragments de PCR, des sites de restriction sont rajoutés aux extrémités des amorces. Deux températures d'hybridation sont alors utilisées. La première est calculée sans tenir compte des séquences des sites de restriction rajoutées qui ne s'hybrident pas à la matrice, 5 cycles de synthèse sont alors effectués en début de réaction avec celle-ci. Puis 25 cycles sont effectués avec la seconde température d'hybridation correspondant à la totalité de la longueur des amorces.

### **3. 2. Electrophorèse d'ADN**

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer, elle peut varier de 0,3 à 2%. Dans la majorité des cas, nous utilisons des gels d'agarose à 1 % en tampon TAE, avec 1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons à déposer sur le gel sont, au préalable, additionnés de 1/5 (v/v) d'une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol FP 0,25 %, glycérol 30%) afin de visualiser la migration et d'augmenter la densité des échantillons pour les entraîner au fond du puits. Après une migration entre 25 et 100 V, selon la taille des échantillons, l'ADN est visualisé par fluorescence du BET sous ultraviolets (UV, 312 nm).

### **3. 3. Extraction des fragments d'ADN**

Après migration de l'ADN dans un gel d'agarose, le fragment d'intérêt est découpé rapidement sur table UV. L'extraction est réalisée en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon le protocole spécifié. L'agarose est dissout, puis l'ADN est piégé par une matrice de silice, lavée avec une solution contenant de l'éthanol, puis élué avec un tampon d'éluion ou de l'eau.

### **3. 4. Digestion enzymatique**

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN sont des endonucléases bactériennes. Une séquence comprise dans un plasmide peut ainsi être excisée pour être clonée, ou être remplacée...etc. Les enzymes sont utilisées suivant les instructions des fabricants (Roche, Invitrogen; France) à des concentrations de 1 à 2 U/µg d'ADN/heure. Les conditions d'incubation peuvent varier selon l'enzyme, mais la plupart ont une activité optimale à 37°C. Si nécessaire, l'enzyme peut être inactivée par exposition à une température de 65°C pendant 15 mn. La digestion peut être vérifiée par une migration sur gel d'agarose.

### **3. 5. Clonage**

Le terme de clonage désigne un ensemble d'étapes de manipulation des acides nucléiques permettant d'aboutir à une construction d'ADN particulière : fusion transcriptionnelle, fusion traductionnelle, délétion de tout ou partie d'une séquence ... etc.



### 3. 5. 1. Sous clonage

Cette étape est utilisée pour disposer en quantités importantes d'un fragment d'ADN encadré par les sites de restriction voulus. Le système utilisé dans ce travail est le système Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA) pour le clonage des fragments de PCR à bouts francs (générés par la Pfu). En effet le sous clonage est réalisé selon le protocole du fabricant du kit.

### 3. 5. 2. Déphosphorylation

Cette étape est généralement utilisée, lors du clonage d'un fragment d'intérêt dans un plasmide linéarisé afin d'empêcher la recircularisation du plasmide sans inclure l'insert. Ceci permet l'augmentation du rendement d'insertion du fragment d'intérêt. La phosphatase alcaline de crevette (*shrimp alkaline phosphatase*) possède une activité de déphosphorylation du phosphate en 5' d'un brin d'ADN. Si les deux extrémités d'un plasmide sont ainsi traitées, la ligation ne pourra pas se faire entre elles, mais uniquement avec une extrémité non déphosphorylée, en l'occurrence celle du fragment à cloner.

La réaction de déphosphorylation s'effectue généralement dans un volume total de 10 µl. Ceci dans le tampon de l'enzyme avec 1 unité d'enzyme et 50 ng d'ADN à 37°C pendant 60 mn. Après, l'enzyme est inactivée par incubation à 65°C pendant 15 mn.

### 3. 5. 3. Ligation

On utilise habituellement la T4 ligase. Les fragments en présence ont soit des extrémités cohésives générées par la même enzyme de restriction (ce qui facilite la ligation), soit tout deux des extrémités franches (ce qui diminue le rendement de la réaction). L'obtention d'extrémités franches est un préalable si les extrémités à fusionner n'ont pas été générées par la même enzyme ou par des enzymes différents générant des extrémités compatibles.

### 3. 5. 4. Génération d'extrémités à bout franc par le fragment de Klenow

Le fragment de Klenow est issu de l'ADN Polymérase I sans activité exonucléase de 5' en 3'. Il permet de combler les extrémités 5' sortantes d'un fragment de restriction grâce à son activité polymérase de 5' en 3', générant ainsi des extrémités à bout franc. La réaction nécessite la présence de dNTP et s'effectue à 37°C dans le tampon spécifique de l'enzyme.

### 3. 6. Transformation

#### 3. 6. 1. Transformation d'*E. coli*

La transformation est réalisée en ajoutant 3 à 5 µl du plasmide ou de la solution de ligation dans 100 µl de bactéries compétentes, immédiatement après décongélation. Après 30 minutes d'incubation dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique par un passage de 45 secondes à 42°C. Après 2 minutes de refroidissement dans la glace, 450 µl du milieu LB sont ajoutés et les bactéries transformées sont incubées à 37°C pendant 1 heure et sous agitation (250 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection et incubation à 37°C.

#### 3. 6. 2. Transformation de *P. aeruginosa* par électroporation

La transformation d'un vecteur dans *P. aeruginosa* par électroporation consiste à rendre les cellules perméables à l'ADN au moyen d'une décharge électrique. On utilise la technique d'Enderle et Farwell afin de préparer des cellules électrocompétentes (Enderle et Farwell, 1998). Dans ce travail, les bactéries ont été rendues compétentes à l'électroporation de deux façons : soit le lavage à l'eau d'une culture en milieu solide (Enderle and Farwell, 1998) soit le lavage au sucrose à 300 mM d'une culture en milieu liquide (Choi *et al.*, 2006). Dans le premier cas, une culture de 16 heures en milieu solide est utilisée; on prélève les bactéries que l'on lave deux fois à l'eau stérile avant une resuspension dans l'eau. Dans le deuxième cas, une culture liquide de 16 heures est utilisée; les bactéries sont lavées deux fois dans de l'eau stérile contenant 300 mM de sucrose puis remises en suspension dans la même solution.

Après cette étape, 50 µL de bactéries sont incubées 30 mn dans la glace avec environ 25 ng d'ADN plasmidique, puis soumises à l'électroporation. Cette dernière est réalisée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie à -20°C sur laquelle est appliquée une décharge de 1800 V pendant 5 millisecondes (appareil Electro Cell Manipulator ECM 399, BTX, Genetronic Inc, San Diego, CA). Le mélange est repris dans 1 mL du milieu LB puis incubé 1 heure à 37°C sous agitation (250 rpm). Les transformants sont sélectionnés sur milieu PIA ou LB contenant l'antibiotique approprié.

### 3. 7. Préparation d'ADN chromosomique de *P. aeruginosa*

Une culture de 16 heures de 2 mL de *P. aeruginosa* est centrifugée 5 minutes à 17500 g, lavée dans le PBS, puis le culot est repris dans 500 µl d'une solution de pH 8 composée du

NaCl à 0,15 M et d'EDTA à 0,1 M. La lyse des bactéries est réalisée à 60°C en présence de 2% du SDS. La lyse complète est indiquée par un éclaircissement de la solution. La réaction est arrêtée par l'ajout de 75 µl de perchlorate de sodium à 5 M. On réalise ensuite une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Cette étape permet la purification de l'ADN présent dans une solution contenant aussi des protéines. On ajoute à la solution un volume du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 v/v/v). Les deux phases sont mélangées vigoureusement (vortex) puis séparées par une centrifugation de 15 minutes à 17500 g. La phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée délicatement puis lavée par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) afin d'éliminer le phénol résiduel. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité à l'éthanol absolu à -20°C. Après séchage à température ambiante, l'ADN est repris dans de l'eau et conservé à +4°C.

### 3. 8. Préparation d'ADN plasmidique

Plusieurs méthodes ont été développées pour la purification des plasmides à partir des bactéries. Ces méthodes impliquent trois étapes : la préparation d'une culture bactérienne, la récupération et lyse des bactéries et la purification du plasmide. La technique dite de « miniprep » permet une extraction et une purification d'ADN plasmidique rapide et simple à partir d'une culture liquide.

Nous avons utilisé le kit QIAprep Miniprep (Quiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN plasmidique est purifié par adsorption sur une colonne de silice. C'est la procédure décrite par le fabricant du kit qu'a été suivie.

### 3. 9. Dosage des acides nucléiques

Deux méthodes pour le dosage des acides nucléiques :

- La spectrophotométrie (Sambrook *et al.*, 1989) : cette technique mesure la quantité des irradianations ultraviolettes absorbées par les bases. L'absorbance est mesurée à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm. La lecture à 260 nm permet de savoir la concentration de l'acide nucléique dans l'échantillon. Le ratio des deux lectures à 260 nm et 280 nm donne une estimation de la pureté de l'acide nucléique. Une préparation pure d'ADN ou ARN correspond à un ratio de 1,8 et 2,0 respectivement. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre (BIO-RAD, SmartSpec<sup>TM</sup>Plus Spectrophotometer, U.S.A).

- Electrophorèse sur gel d'agarose : si l'échantillon à doser ne contient pas assez d'ADN (<250 ng/mL) ou ce dernier est fortement contaminé par des substances absorbant des ultraviolets. La quantité de fluorescence émise par le BET est proportionnelle avec la masse totale de l'ADN. La quantité d'ADN dans l'échantillon est estimée en comparant le niveau de fluorescence de l'échantillon et celui du marqueur de poids moléculaire. 1 à 5 ng peuvent être détectées par cette méthode.

### **3. 10. Mutagenèse par échange allélique chez *P. aeruginosa***

L'échange allélique est effectué par une double recombinaison homologue entre les séquences homologues aux séquences flanquantes du gène d'intérêt. La technique utilisée est celle développée par Quénée et ses collègues qui a été adaptée du travail de Schweizer et Hoang et de Marx et Lidstrom (Quénée *et al.*, 2005). Elle repose sur l'utilisation d'un vecteur suicide, pEX100Tlink, incapable de se répliquer chez *P. aeruginosa*. Il possède un site de clonage multiple, le gène *bla3* qui confère une résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline pour *P. aeruginosa* et le gène *sacB* qui induit une sensibilité au saccharose. Le produit du gène *sacB* est une enzyme permettant de dégrader le saccharose; il en résulte un dérivé toxique pour la bactérie.

#### **3. 10. 1. Echange allélique**

Les fragments de 1 à 2 kb, correspondant aux séquences flanquantes 5' et 3' du gène d'intérêt, sont d'abord clonés dans le vecteur pEX100Tlink, puis la cassette *aacCI* conférant une résistance à la gentamicine est insérée entre ces deux fragments. Cette cassette est flanquée de deux courtes séquences nucléotidiques, *loxP*, reconnues par la recombinase Cre qui permettra d'exciser le gène de résistance *aacCI* une fois la double recombinaison sélectionnée. Ce vecteur est ensuite transféré dans la souche de *P. aeruginosa* par conjugaison biparentale.

#### **3. 10. 2. Conjugaison biparentale**

La conjugaison biparentale est réalisée avec la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le vecteur d'échange allélique. La souche d'*E. coli* et la souche de *P. aeruginosa* sont cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis mélangées et déposées, sans étalement, sur le milieu LB gélosé sans NaCl. Après une nuit à 37°C, la culture est reprise dans 1 mL du milieu LB et étalée sur le milieu PIA contenant de la gentamicine. Le vecteur pEX100Tlink

ne pouvant se répliquer dans *P aeruginosa*, seules les souches ayant intégré la cassette *aacCI* par simple ou double recombinaison homologue entre les séquences flanquantes du gène d'intérêt pourront se développer sur ce milieu.

### 3. 10. 3. Sélection des clones double recombinant

L'événement de recombinaison peut être simple ou double. Une simple recombinaison, entre une séquence flanquante du gène d'intérêt au niveau du plasmide et son homologue génomique entraîne l'insertion complète du plasmide pEX100Tlink, incluant les gènes *bla* et *sacB*, dans le génome. Chez ces clones simples recombinant (SR), le gène d'intérêt est reconstitué et non invalidé. Lors d'un événement de double recombinaison homologue, un pour chaque partie flanquante du gène, le gène d'intérêt est remplacé par la cassette *aacCI* sans incorporation des gènes *bla* et *sacB* dans le génome. Ce sont ces clones doubles recombinant (DR) que l'on cherche. En premier lieu, les clones recombinants, ayant incorporé dans leur génome la cassette *aacCI*, sont sélectionnés sur milieu PIA contenant de la gentamicine. La proportion de clones DR obtenue ensuite est variable selon le gène ciblé, en raison des différents niveaux de compaction de l'ADN qui rendent des zones du génome plus ou moins accessible à la recombinaison. Ensuite, les colonies sont contre sélectionnées sur le milieu PIA avec 5% du saccharose grâce au gène *sacB*. Du fait de la toxicité qu'entraîne la présence de ce gène sur ce milieu, seuls les clones ayant éliminé *sacB* pourront se développer. Ceci se produit soit par réversion du premier événement de recombinaison, soit par un second événement de recombinaison conduisant à une souche DR. Ces clones contre sélectionnés sont ensuite repiqués sur milieu PIA gentamicine pour éliminer les révertants et sur PIA cabénicilline afin de sélectionner les clones DR.

Ces mutants par insertion/délétion, avec un profil double recombinant, sont ensuite vérifiés par PCR sur ADN génomique.

### 3. 10. 4. Excision de la cassette de résistance

Les clones DR sont électroporés avec le plasmide pCM157 portant un gène de résistance à la tétracycline et le gène codant la recombinase Cre. Cette enzyme reconnaît la séquence *loxP* et entraîne une délétion par une recombinaison entre deux sites *loxP*. Les clones transformants sélectionnés sur tétracycline sont ensuite cultivés en milieu LB liquide supplémenté de tétracycline afin de permettre l'expression de l'enzyme Cre et l'élimination

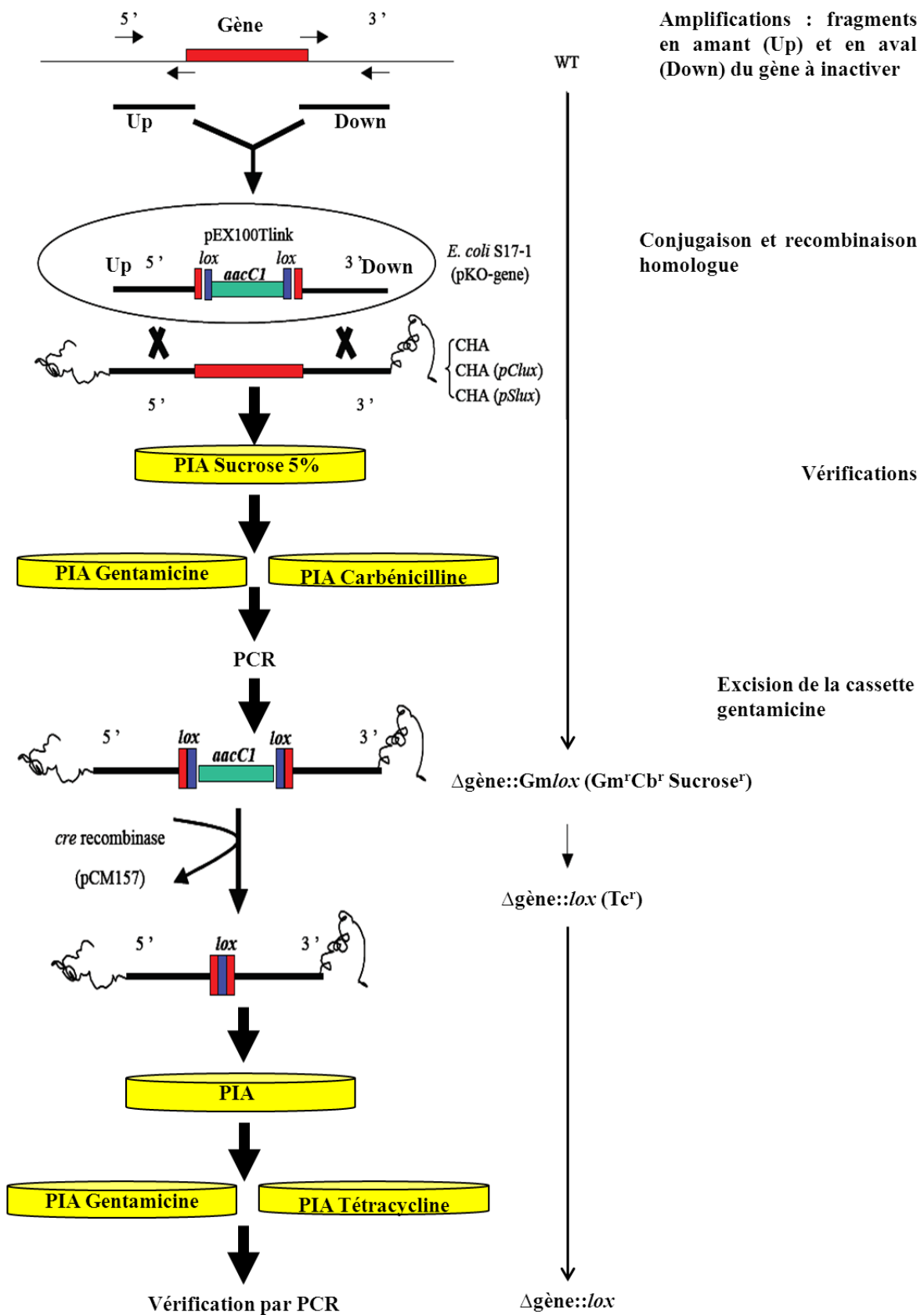


Figure 18 : Procédure d'inactivation des gènes par le système *cre-lox*.

du gène *aacCI*. Ensuite, on cure le plasmide pCM157 en réalisant plusieurs cultures en milieu LB liquide sans antibiotique. Enfin, les colonies sont repiquées sur milieu PIA, PIA tétracycline pour vérifier que le plasmide a été curé et sur milieu PIA gentamicine afin de sélectionner les clones ne possédant plus la cassette *aacCI*. L'excision de ce gène est vérifiée par PCR sur l'ADN génomique de ses mutants.

### 3. 11. Souches de *P. aeruginosa* contenant une fusion transcriptionnelle rapportrice dans le chromosome

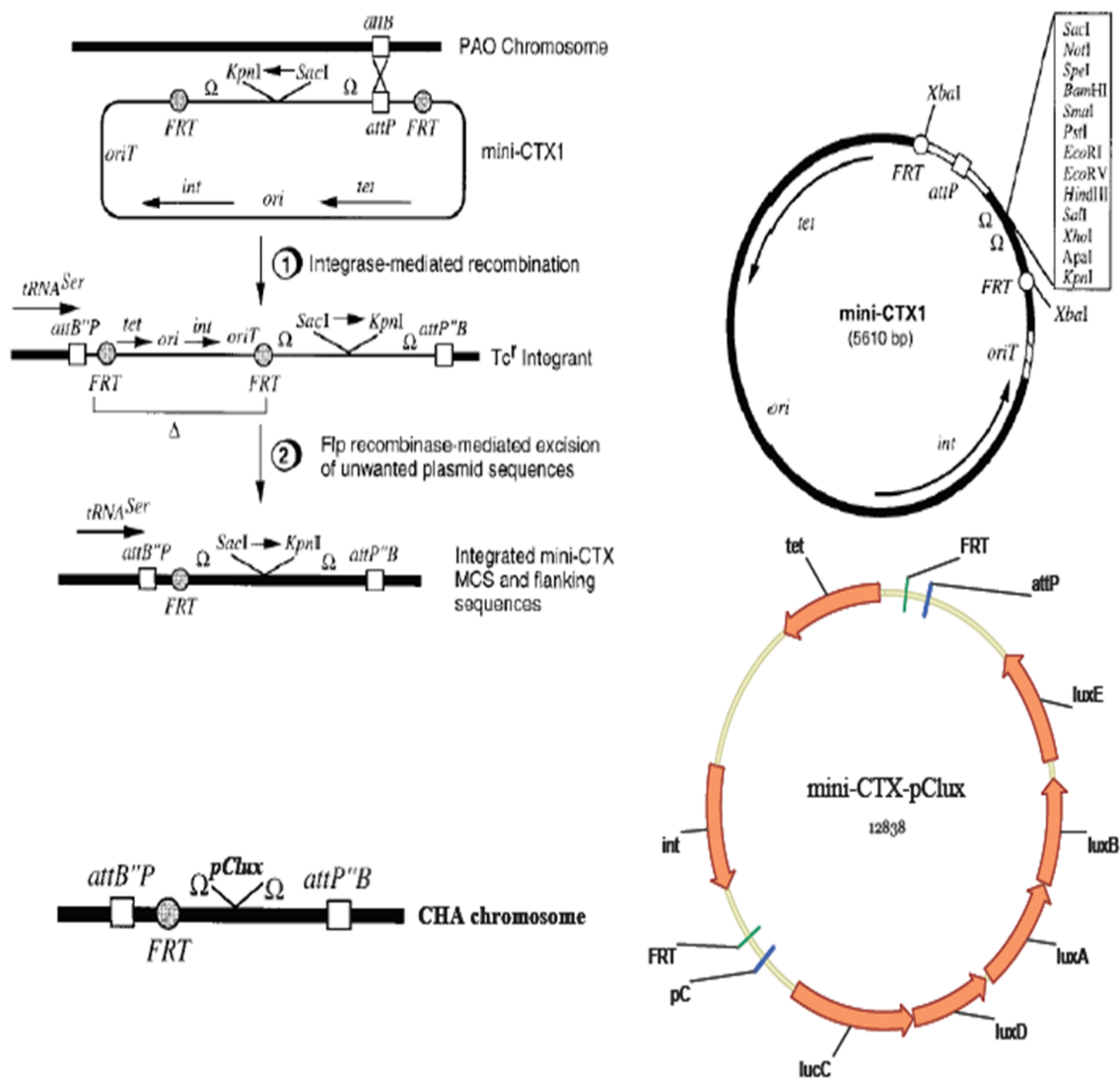


Figure 19 : Construction des fusions transcriptionnelles rapportrices (D'après Hoang *et al.*, 1998).

Afin d'étudier le niveau de transcription de certains gènes, nous avons utilisé la technique développée par Laskowski (Laskowski *et al.*, 2004) et Schweizer (Becher and Schweizer, 2000) pour réaliser des constructions rapportrices. En effet, le plasmide mini-CTX-*pgène-lux* contenant le promoteur du gène d'intérêt (*pgène*) a été mobilisé dans la souche de *P. aeruginosa* par conjugaison. Après intégration dans le chromosome, le reste du plasmide est excisé par la Flp recombinase comme décrit précédemment (figure 19) (Hoang *et al.*, 1998). Chaque construction rapportrice est présente en une seule copie intégrée dans le site *attB* du chromosome bactérien (Laskowski *et al.*, 2004).

### 3. 12. Complémentation des mutants

Afin de confirmer que le phénotype du mutant est dû à la délétion du gène et pas aux effets polaires de la délétion, certains mutants ont été complétés avec le plasmide pUCP20 contenant la séquence du gène qu'a été délité du chromosome de la bactérie. Dans une première étape, le gène d'intérêt est amplifié par PCR. Le produit contient deux sites de restriction. Après une étape de sous-clonage et vérification par digestion et séquençage, le gène est inséré dans le plasmide pUCP20 digéré par les enzymes de restrictions correspondants aux sites des deux extrémités du fragment à insérer. Le plasmide résultant est mobilisé dans la souche de *P. aeruginosa* par électroporation. Les bons clones sont sélectionnés sur le milieu PIA contenant de la carbénicilline grâce au gène *bla*.

## 4. Techniques de biochimie

### 4. 1. Activation du SSTT de *P. aeruginosa*

Le SSTT de *P. aeruginosa* est inductible par contact avec une cellule cible ou par le sérum. *In vitro*, il peut être activé par déplétion calcique. Du milieu LB, avec antibiotique si nécessaire, estensemencé à une DO<sub>600</sub> de 0,1 à partir d'une préculture de 16h. Lorsque cette culture a atteint une DO<sub>600</sub> entre 0,8 et 1,2, deux lavages sont réalisés avec du milieu LB frais. À partir de cette culture le milieu d'induction et le contrôle négatif sontensemencés à une DO<sub>600</sub> de 0,2. Le milieu d'induction est en règle générale du LB complété par 5 mM d'EGTA, un chélateur des ions calcium et 20 mM du MgCl<sub>2</sub> pour compléter le milieu en ions divalents afin de permettre une bonne croissance des bactéries. Une culture dans le LB à 0,5 mM du CaCl<sub>2</sub> est réalisée comme contrôle négatif.



#### 4. 2. Mesure de l'activation transcriptionnelle des gènes du SSTT par luminescence

L'analyse de l'activité transcriptionnelle des gènes du SSTT a été réalisée par mesure de la bioluminescence émise par les bactéries possédant l'opéron *luxCDABE*. Les promoteurs de l'opéron *exsCEBA* ou du gène *exoS* ont été fusionnés en amont de l'opéron *luxCDABE* sans promoteur donnant les plasmides mini-CTX-*pClux* et mini-CTX-*pSlux*. Les gènes rapporteurs ont ensuite été transférés dans le chromosome de différentes souches de *P. aeruginosa* au niveau du gène *attB* par recombinaison homologue (cf. § III. 11.). Les souches suivent le protocole d'activation du SSTT et la luminescence est mesurée par un spectrophotoluminomètre (TriStar LB 941, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Germany). Des unités relatives de luminescence (RLU) de la culture, rapportées à la DO<sub>600</sub>, permettent d'estimer l'activité transcriptionnelle du promoteur.

#### 4. 3. Les protéines secrétées par le SSTT

Lorsque des cultures en condition induite et non induite ont atteint des DO<sub>600</sub> entre 1,5 et 1,8, une centrifugation de 10 min à 15000 g est réalisée et les surnageants sont récoltés. Cependant, pour visualiser les protéines présentes dans ces surnageants de culture, il est préférable de les concentrer par précipitation. Les culots peuvent aussi être récupérés et lysés afin de détecter les protéines qui n'ont pas été secrétées par le SSTT.

##### 4. 3. 1. Précipitation au PCA

L'acide perchlorique (PCA) à 15 %, à 4°C pendant une nuit, entraîne la précipitation des protéines contenues dans une solution aqueuse. Les protéines sont ensuite centrifugées pendant 30 min à 17000g et lavées au moins trois fois à l'acétone froide (-20°C). Une fois l'acétone du dernier lavage complètement évaporé, l'échantillon de protéines est sous forme d'un culot sec. Ce culot peut être repris dans un petit volume du tampon de charge (TrisHCl mM pH 6,8, β-mercaptoéthanol, 10%, SDS 4%, bleu de bromophénol 0,04%, glycérol 40%) d'électrophorèse SDS-PAGE.

##### 4. 3. 2. Dénaturation

Le tampon de charge a un pouvoir dénaturant et les protéines peuvent être conservées dans ce tampon à -20°C. Le SDS, en s'intercalant au niveau des différents acides aminés de la protéine, permet de la charger proportionnellement à sa longueur, et par ailleurs de supprimer

sa structure secondaire. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol permet la rupture des ponts disulfure. Une étape supplémentaire de dénaturation sera réalisée avant migration en exposant les protéines à une température de 95°C pendant 5 min. Ceci permet à la protéine de migrer préférentiellement selon sa masse et non selon sa structure.

### 4. 3. 3. Electrophorèse SDS-PAGE

Le gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) est généralement composé d'une partie supérieure ou gel de concentration placé au dessus d'un gel de séparation (partie inférieure).

Concentration	6%		8%		10%		12%		15%	
Volume/ Composants	10mL	30mL	10mL	30mL	10mL	30mL	10mL	30mL	10mL	30mL
H <sub>2</sub> O	5,3	15,9	4,6	13,9	4,0	11,9	3,3	9,9	2,3	6,9
30 % acrylamide/bis	2,0	6,0	2,7	8,0	3,3	10,0	4,0	12,0	5,0	15,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5
10 % SDS	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3
10% AP	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3
TEMED	0,008	0,024	0,006	0,018	0,004	0,012	0,004	0,012	0,004	0,012

**Tableau 8 : Solutions pour la partie supérieure du gel SDS-PAGE.**

Le gel de concentration est faiblement concentré en polyacrylamide (5%) et permet à toutes les protéines d'un dépôt de se retrouver sur une même ligne de migration après application d'un champ électrique. Le pourcentage d'acrylamide du gel de séparation varie selon la taille des protéines à séparer. La plupart des gels contiennent 8 à 15 % d'acrylamide. Les protéines sont dénaturées dans le tampon de dépôt (Tris pH 6,5 50mM, 0,05% Bleu de Bromophénol en Glycérol, EDTA pH 7 10 mM, SDS 20%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5%) et par chauffage à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposées sur le gel de concentration.

Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue à 20 mA dans le tampon d'électrophorèse (TrisHCl 25 mM pH 8, glycine 200 mM, SDS 0,1%). Le bleu de bromophénol permet de suivre le front de migration. Lors de ce travail, la coloration des gels a employé une solution de bleu de Coomassie R250 à 2g/l, éthanol 50%, acide acétique 10%.

Volume/ Composants	1mL	2mL	5mL	6mL
H <sub>2</sub> O	0,68	1,4	3,4	4,1
30 % acrylamide/bis	0,17	0,33	0,83	1,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,63	0,75
10 % SDS	0,01	0,02	0,05	0,06
10% AP	0,01	0,02	0,05	0,06
TEMED	0,001	0,002	0,005	0,006

**Tableau 9 : Solutions pour la partie inférieure du gel SDS-PAGE.**

#### 4. 4. Analyse des protéines

##### 4. 4. 1. Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines du gel d'acrylamide sont colorées, une heure, par le bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v) (Merck, Darmstadt, Germany) dilué dans une solution d'acide acétique/éthanol/eau (v/v/v/, 10/50/40). Le bleu de Coomassie se fixe non spécifiquement aux protéines et pas au gel. La décoloration par une solution d'acide acétique/éthanol/eau (v/v/v/, 10/30/60) fait apparaître les protéines qui retiennent la coloration bleue. Le gel est séché entre deux feuilles de cellophane afin d'être conservé.

##### 4. 4. 2. Western blot

Après séparation des protéines par migration électrophorétique SDS-PAGE, il est possible de détecter spécifiquement la présence d'une protéine donnée. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et mises en évidence par immunomarquage grâce à un anticorps spécifique.

##### 4. 4. 2. 1. Transfert semi-sec

Le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose se fait dans un appareil de transfert semi-sec. Entre des feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 129 mM, Méthanol 10%, SDS 0,01%). Le gel d'acrylamide contenant les protéines est déposé sur une membrane de nitrocellulose. Ce « sandwich » est réalisé entre

deux électrodes et le transfert du gel d'acrylamide sur la membrane est réalisé sous un courant de 60 mA pendant 1 heure.

#### **4. 4. 2. 2. Immuno-détection**

Après le transfert, la membrane est saturée 45 min avec une solution de TBS 1X (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5) contenant 0,05 % de Tween20 et 5 % du lait écrémé. L'action détergente du Tween20 et l'action saturante des protéines du lait préparent la membrane pour l'immuno-détection par un anticorps spécifique. La membrane est ensuite lavée à plusieurs reprises par du TBSTween 1X. L'anticorps spécifique de la protéine à détecter est dilué à la concentration requise (entre 1/500ème et 1/5000ème) dans du TBSTween 1X et incubé sur la membrane pendant 1h30. La membrane est lavée à plusieurs reprises par du TBSTween 1X afin d'éliminer l'excédent d'anticorps primaire et les liaisons non spécifiques. La localisation de la fixation de cet anticorps sur la membrane se fait avec un anticorps secondaire, spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est dilué à la concentration requise (entre 1/2000ème et 1/10000ème) dans du TBSTween 1X et incubé sur la membrane durant 45 min. Il peut être couplé à la peroxydase pour une détection en chimiluminescence.

### **4. 5. Recherche d'inhibiteur (s) du SSTT dans le surnageant d'une culture en phase stationnaire de *P. aeruginosa***

#### **4. 5. 1. Préparation du surnageant**

Une préculture de 16 heures, lavée deux fois dans le LB, est utilisée pour ensemercer une culture en LB de volume X à une DO<sub>600</sub> de 0,05. Après 6 heures de culture (DO<sub>600</sub> entre 3 et 4), les bactéries sont centrifugées 10 min à 10000g. Le surnageant est éliminé et les bactéries sont lavées dans le milieu VB. Ces dernières sont resuspendues dans le même volume X du milieu VB et sont remises en culture pendant 16 heures (une nuit) à 37°C et sous agitation (250 rpm). Après, une centrifugation à 15000g et 4°C durant 45 min, le surnageant est récupéré. Après filtration à 0,20 µm, ce dernier peut être conservé à 4°C ou -20°C.

#### **4. 5. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice du surnageant**

L'analyse de l'activité transcriptionnelle des gènes du SSTT a été réalisée par mesure de la bioluminescence émise par les bactéries possédant l'opéron *luxCDABE*. Les promoteurs de

l'opéron *exsCEBA* ou du gène *exoS* ont été fusionnés en amont de l'opéron *luxCDABE* sans promoteur donnant les plasmides mini-CTX-*pClux* et mini-CTX-*pSlux*. Les gènes rapporteurs ont ensuite été transférés dans le chromosome des différentes souches de *P. aeruginosa* au niveau du gène *attB* par recombinaison homologue (cf. § III. 11.). Les souches suivent le protocole d'activation du SSTT et la mesure par un spectrophotoluminomètre (TriStar LB 941, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Germany) des unités relatives de luminescence (RLU) de la culture, rapportées à la DO<sub>600</sub>, permettent d'estimer l'activité transcriptionnelle du promoteur.

#### 4. 5. 3. Précipitation et extraction

Le surnageant est mélangé avec deux volumes d'éthanol absolu. Il est mis à -20°C pendant 2 heures. Ceci permet la précipitation des sels et des protéines. Ces derniers sont éliminés par une centrifugation à 9000g durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite passé au Rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-14, Suisse) ou au Speed VAC® à 40°C pour éliminer l'éthanol. Il est repris dans de l'eau distillée en le concentrant 10 fois. Après, une extraction volume-volume est réalisée à l'acétate d'éthyle acidifié à l'acide acétique à hauteur de 0,004% selon la méthode décrite par Pesci et ses collègues (Pesci *et al.*, 1999). Après décantation, la phase aqueuse est récupérée (la phase la plus dense) et lyophilisée.

#### 4. 5. 4. Analyses par chromatographie en phase liquide à Haute Performance (CLHP)

##### 4. 5. 4. 1. Fractionnement par CLHP semi-préparative

Cette technique permet de purifier la/les molécule(s) contenu dans le signal inhibiteur du SSTT. En outre, elle permet de récupérer des quantités suffisantes pour des analyses ou des tests ultérieurs. Le surnageant lyophilisé est repris dans la phase mobile méthanol/eau (50%/50% vol/vol) afin d'être fractionné. Le fractionnement dont les conditions ont été déterminées par CLHP analytique a été effectuée avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol) à 25°C. La colonne utilisée est une colonne en phase inverse de type C18 dont les dimensions sont 250 x 10 mm et une granulométrie de 5µm (Interchim®). Le volume injecté est de 4 mL et le débit de la colonne est de 50 mL/min. L'appareil de chromatographie en phase liquide à Haute Performance (Varian®, model Prep Star n°218) est relié à un détecteur PDA, UV (Varian®, model Pro Star) et un collecteur de fractions (Varian®, model Pro Star n°701). Ce dernier permet de collecter une fraction toutes les cinq

minutes. Les fractions intéressantes sont ensuite passées au Speed VAC® ou au rotavapor pour éliminer le solvant et être analysées par spectrométrie de masse.

#### 4. 5. 4. 2. Analyse par ESI-LC/MS

Pour déterminer le type de molécules présentes dans le surnageant de culture, celui-ci a été analysé par chromatographie suivie d'une spectrométrie de masse à trappe ionique (ESI-LC/MS). Le surnageant lyophilisé ou certaines de ses fractions sont repris dans la phase mobile méthanol/eau (50%/50% vol/vol) acidifiée à l'acide TriFluoroAcétique (TFA). Ce dernier permet de charger les ions afin de les séparer selon leur taille. L'appareil utilisé se compose de la partie (LC) pour la chromatographie liquide (Dionex, modèle Ultimate 3000) couplée à un spectromètre de masse (Bruker, modèle MicroTof-Q2). Cet appareil peut donner des formules brutes, possibles correspondantes aux m/z enregistrées. L'analyse a été effectuée avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol) à 25°C, pour des m/z comprises entre 100 et 1500, et avec une colonne en phase inverse de type C18 dont les dimensions sont 250 x 4,6 mm et une granulométrie de 5µm (Interchim®). Le volume injecté est de 20 µL et le débit de la colonne est de 8 mL/min. Pour une identification des molécules détectées, un séquençage par spectrométrie de masse en tandem (ESI-LC/MS/MS) a été réalisé.

La CLHP a été également utilisée pour doser la phénazine-1-carboxylate dans le surnageant de différentes cultures de *P. aeruginosa*. Ceci a été réalisé dans les mêmes conditions c.à.d. élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol) à 25°C et avec une colonne analytique en phase inverse de type C18.

#### 4. 6. Dosage des kynurénines

Afin de doser les kynurénines et notamment la L-kynurénine accumulée dans le surnageant des cultures bactériennes, nous avons utilisé le réactif d'Ehrlich Kovacs (Sigma). Ce dernier contient le n-Butanol, l'acide chlorhydrique et le Diméthylamino-4-benzaldéhyde. Il est utilisé dans la recherche de l'indole. Après une centrifugation à 10000g, le surnageant bactérien est récupéré et filtré à 0,20 µm. 100 µL de ce dernier sont mélangés avec 100 µL du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de la kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons est déterminée. Le milieu LB a été utilisé comme contrôle négatif.

D'autre part, la CLHP a été également utilisée pour doser la L-kynurénine dans le surnageant de différentes cultures de *P. aeruginosa*. En effet un volume de 20 µL a été injecté dans une colonne C8 d'une granulométrie de 5µm (Varian®). L'analyse a été effectuée à 26°C avec une élution isocratique méthanol/eau (7%/93% vol/vol) et un débit de 0.75 mL/min.

#### 4. 7. Dosage des anticorps par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Afin d'évaluer la réponse humorale des trois souches CHA, CHAΔ*kynA* et CHAΔ*kynU*, 3 groupes de 6 souris chacun ont été utilisés (en plus d'un groupe témoin). Chaque souris a été injectée par 100 µL d'une suspension contenant  $3 \times 10^6$  bactéries de la souche adéquate. Le titre des anticorps dirigés spécifiquement contre les trois protéines ExoA (5 µg/mL d'eau, Sigma), PcrV (10µg/mL du Tris, donnée par le Dr Ina Attrée (Gébus *et al.*, 2008, laboratoire de Pathogénie Bactérienne et Réponses Cellulaires (PB&RC), CEA de Grenoble) et OprF sous forme de protéoliposome recombinant (2,5 µg/mL) (Bruno Marques, thèse de l'Université Joseph Fourier, 2010) est quantifié par ELISA. Pour chaque protéine, 100 µL sont déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits (Maxisorp, nunc) puis incubée durant la nuit à 4°C sans agitation (pour chaque protéine, la quantité à déposer a été déterminée pendant une étape antérieure de mise au point). Après 3 lavages par le PBS-tween 0.05%, les puits sont saturés (300 µL/puits du PBS-TW 0,1% + SVF 10% + BSA 2%) pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation douce. À nouveau les puits sont lavés 3 fois comme précédemment. Le sérum prélevé de chaque souris (par voie rétro-orbitale) a été dilué de 1/1000 jusqu'à 1/128000 (dans du PBS-TW 0,05% + BSA 1% + SVF 5%) et 100 µL de chaque dilution ont été déposés. La plaque a été incubée pendant 1h30 à température ambiante et sous agitation douce. Après, trois lavages ont été effectués comme précédemment, et la plaque est hybridée avec 100 µL/puits d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/1500 (dans du PBS-TW 0,05% + BSA 1% + SVF 5%). La plaque a été incubée 1 heure à température ambiante sous agitation douce. Après trois lavages, 100 µL de l'avidine diluée au 1/3000 (dans du PBS-TW 0,05% + BSA 1% + SVF 5%) ont été ajoutés à chaque puits. La plaque a été incubée 30 minutes à température ambiante sous agitation douce. Après, 100 µL du substrat, le pNPP (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate), dilué dans le tampon diethanolamine à concentration finale de 1mg/mL ont été ajoutés à chaque puits. Par la suite, il faut laisser développer pendant 30 à 90 minutes à l'obscurité avant lecture à 405 nm et 620 nm. Une

normalisation des titres a été réalisée par rapport au contrôle (sérum des souris injectées par le PBS).

## **5. Production des anticorps anti-OprF**

### **5. 1. Production**

La production des anticorps anti-Oprf a été réalisée en ascite. Des souris Balb/C reçoivent une injection intra-péritoniale de 0,5 mL du Pristane (Sigma) et une semaine plus tard,  $10^6$  cellules du clone produisant l'anticorps (préparé sous la direction du Dr Habib à l'UVHCI, EMBL, Grenoble) sont injectées par voie intra-péritoniale à chaque souris. L'apparition et le développement des ascites sont observés après un délai de 1 à 2 semaines. L'ascite est prélevée stérilement par ponction, centrifugée à 1000 rpm, pendant 10 minutes afin de la débarrasser des cellules puis conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  après adition de glycérol (20% concentration finale).

### **5. 2. Purification par précipitation et dialyse**

Afin de purifier l'anticorps produit, une précipitation aux sulfates d'ammonium à 50 % (p/v) a été réalisée. En effet, des concentrations élevées, proches de la saturation, de sels neutres comme le sulfate d'ammonium déshydratent les groupements hydrophiles des protéines qui deviennent insolubles et précipitent. Chaque protéine précipite dans un intervalle de concentration en sels. Les immunoglobulines précipitent normalement à des concentrations de sulfate d'ammonium relativement faibles en comparaison à la majorité des autres protéines plasmatiques. Le mélange ascite-sulfates d'ammonium est agité pendant 6 heures à température ambiante (ou pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ ) sous agitation douce jusqu'à qu'il devient laiteux. Après, une centrifugation de 30 minutes à 4000 rpm, les anticorps sont repris dans 1/10 du volume de départ du Tris (100mM, pH 8). Cette solution est transférée dans un boudin de dialyse d'un MWCO (Molecular weight cut off) de 12,000 da (l'anticorps est de 150 kDa). Une dialyse a été réalisée contre le Tris (100mM, pH 8), pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  sous agitation douce et en changeant fréquemment le tampon de dialyse. Par la suite, la solution dialysée est récupérée et filtrée à  $0,20\ \mu\text{m}$  afin d'être concentrée sur une colonne de protéine A (Hitrap Protein A HP 1mL, GE Healthcare).



### **5. 3. Purification et concentration sur colonne de protéine A**

Ceci a été réalisé selon le protocole du fabricant (GE Healthcare). En bref, La solution est chargée en boucle avec une vitesse de 0,5 mL/min, sur une colonne de protéine A préalablement équilibrée avec 10 volumes du Tris (100mM, pH 8). La colonne chargée est ensuite lavée par passage de 30 volumes du Tris (100mM, pH 8) à 1mL/min. Les anticorps sont élués avec 4 mL d'acide citrique de 0,1 M et pH 4. Ils sont récoltés dans un tube contenant 500 µL du tampon Tris/HCl 2,5 M, pH 7,8 qui permet de neutraliser le pH de la solution.

Une deuxième dialyse est réalisée comme décrit ci-dessus. Les anticorps récupérés sont concentrés dans un volume de 1 mL grâce à des tubes spéciaux d'un MWCO de 10000 da contenant une cassette de dialyse (MILLIPORE) et une centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm.

### **5. 4. L'isotypage**

L'isotypage des anticorps est réalisé grâce au kit de détection commercialisé par Thermo Fischer (Pierce Rapid Isotyping Kit). Brièvement, le surnageant de culture est dilué dans le tampon de dilution puis 150 µL sont déposés dans un puits. La réaction se développe pendant 15 minutes et l'observation est effectuée à l'œil nu.

### **5. 5. Quantification**

Les anticorps purifiés ont été dosés par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

### **5. 6. Conservation**

La solution d'anticorps purifié peut être stockée avec 0,02 % d'azide à -20°C ou -80°C.

## **6. Manipulation des cellules eucaryotes**

### **6. 1. Macrophages J774**

La culture de cette lignée a été réalisée dans le milieu DMEM supplémenté en pyruvate, 10% SVF, 100 U/mL pénicilline et 100 µg/mL de la streptomycine à 37°C et 5% du CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé plusieurs fois et, avant l'infection, les cellules sont comptées et mises à la concentration souhaitée. Cette lignée nous a été donnée par l'équipe du Dr Joël Plumas (Etablissement Français du sang, Grenoble). Les macrophages J774 ont été obtenues par la

différenciation des mononucléaires du sang périphérique pendant 7 jours et en présence d'un facteur stimulateur : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (500 U/mL, Sandoz) et 2% du sérum autologue. Après purification par centrifugation, les analyses morphologiques et phénotypiques indiquent que 95% des cellules sont des macrophages.

## **6. 2. PLB-985**

La ligné PLB-985 nous a été donnée par l'équipe du Dr Marie José Stasia (Centre Diagnostic et Recherche Granulomatoses septique CGD, CHU de Grenoble; Bionda *et al.*, 2004). Elle correspond à des cellules rondes qui sont les précurseurs des polynucléaires humains. La culture est réalisée dans le milieu RPMI supplémenté en glutamine, SVF 10%, 100 U/mL pénicilline et 100 mg/mL streptomycine à 37°C et 5% du CO<sub>2</sub>.

## **7. Manipulation des animaux**

### **7. 1. Généralités**

Les expérimentations chez l'animal se sont déroulées sur deux sites :

- À la Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) du bâtiment Jean Roget, Faculté de Médecine de Grenoble. Les souris sont maintenues dans un isolateur en dépression, et sont manipulées sous une hotte à flux laminaire. Elles ont accès à volonté à la boisson et à la nourriture ad libitum. Les souris sont anesthésiées par durant quelques secondes par inhalation de sévoflurane puis immobilisées par contention simple. L'ensemble des protocoles utilisés ont été réalisés dans le respect des règles d'éthique établies en expérimentation animale.
- Une autre partie des expérimentations chez l'animal concernant le rôle de la production des kynurénines dans la virulence de la bactérie s'est déroulée au sein du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (D.H.U.R.E) de la Faculté de médecine de Lille par l'équipe du Pr Guery.

Les souris utilisées sont des femelles C57/Bl6 âgées de 6 semaines. Pour la production des anticorps anti-OprF, nous avons utilisé des souris Balb/C.

## **7. 2. Injection**

L'injection des bactéries par voie sous-cutanée est réalisée par une seringue de 500 µl et une aiguille de 29 G. Les bactéries sont cultivées pendant 16 heures, puis remises en culture à  $DO_{600}$  de 0,2 jusqu'à atteindre une  $DO_{600}$  entre 1,5 et 1,8. La culture est alors centrifugée, lavée deux fois au PBS et les bactéries sont remises en suspension dans du PBS à la concentration souhaitée (volume d'injection : 100 µl).

## **8. Statistiques**

L'analyse des résultats a été réalisée par le logiciel GraphPad Prism 5. Les courbes de survies ont été comparées par un test de log-rank. Pour les histogrammes, les analyses ont été réalisées avec le test de Student.

*Partie 3 :*  
*Résultats*



---

## **Chapitre 1 : autorépression du système de sécrétion de type 3 de** ***Pseudomonas aeruginosa***

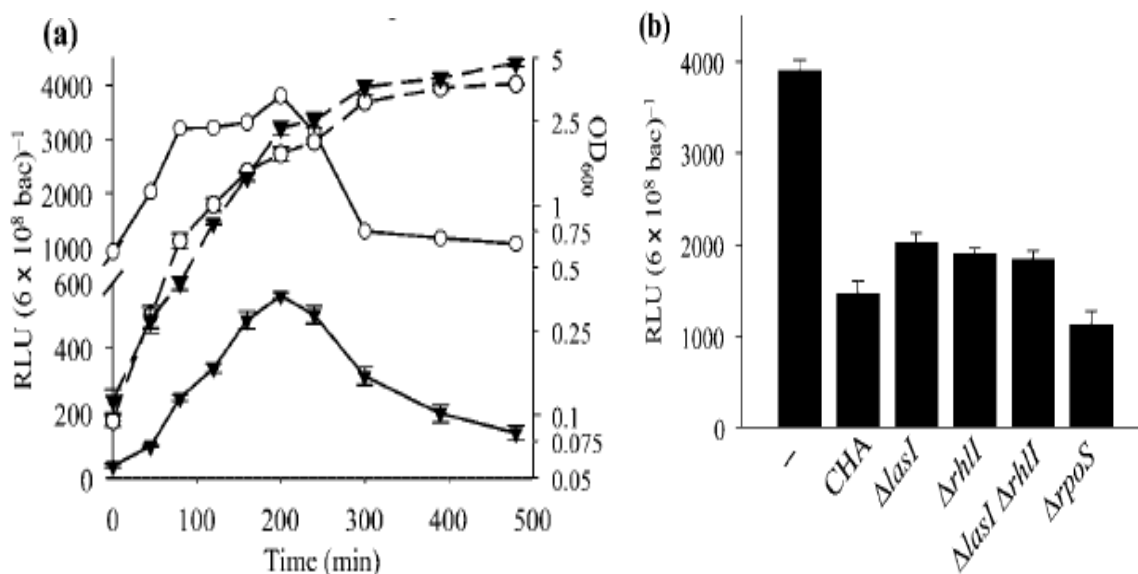
Au cours d'une infection aiguë le SSTT est fortement actif. Les exotoxines secrétées permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire en induisant la mort des neutrophiles et des macrophages (Engel and Balachandran, 2009). Ceci permettra à la bactérie de s'installer et l'infection devient chronique (Dacheux *et al.*, 2000; Roy-Burman *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2004; Dahan *et al.*, 2004; Lucchini *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Faucher *et al.*, 2006). Cette transition entre infection aiguë et infection chronique provoque l'inactivation du SSTT et la formation d'un biofilm (Ventre *et al.*, 2006, Goodman *et al.*, 2004, Heurlier *et al.*, 2004). Déterminer les intervenants de cette régulation du SSTT est un des enjeux majeurs dans la recherche de nouvelles thérapies ciblant ce facteur de virulence.

Depuis quelques années, le laboratoire s'intéresse à ce phénomène, on cherche à identifier la/les voies par lesquelles le SSTT est inactivé au cours de la phase chronique d'infection. Le laboratoire a mis en évidence une nouvelle voie probablement impliquée dans l'inactivation du SSTT au cours de la transition entre infection aiguë et infection chronique (Dakang Shen, Thèse de l'université Joseph Fourier, 2006; Didier Filopon, Thèse de l'université Joseph Fourier, 2005). Cette voie produit un signal répresseur du SSTT. En effet, on a constaté une diminution de l'expression du SSTT en fin de la phase exponentielle et cours de la phase stationnaire de croissance. Un signal d'autorépression sécrété est alors à l'origine de cette diminution. Ce signal a été nommé PARST, pour « *Pseudomonas* Auto Repressor of Secretion Three ».

Il a été démontré que la production de ce dernier est dépendante de la densité cellulaire (figure 20. a). L'ajout d'un surnageant issu d'une culture de *P. aeruginosa* en phase stationnaire réprime l'expression du SSTT d'une culture en phase exponentielle (20. b). Ces travaux ont également montré que le PARST est différent des signaux du quorum sensing classique (figure 20. b). Dakang Shen a testé une banque de mutants de transposition. Puisque un mutant  $\Delta trpA$  ne produit pas du PARST, il a constaté que la production du PARST est dépendante du tryptophane (Shen *et al.*, 2008).

La découverte d'une molécule ou d'un ensemble de molécules capable de réprimer totalement l'expression et l'activité du SSTT est d'une importance considérable. Ceci

permettra de développer une nouvelle thérapie contre *P. aeruginosa*. De ce fait, le but de mon travail était dans un premier temps de comprendre le mécanisme d'action du PARST, puis dans un deuxième temps, j'ai essayé de caractériser la/les molécules constituant ce signal d'autorépression.



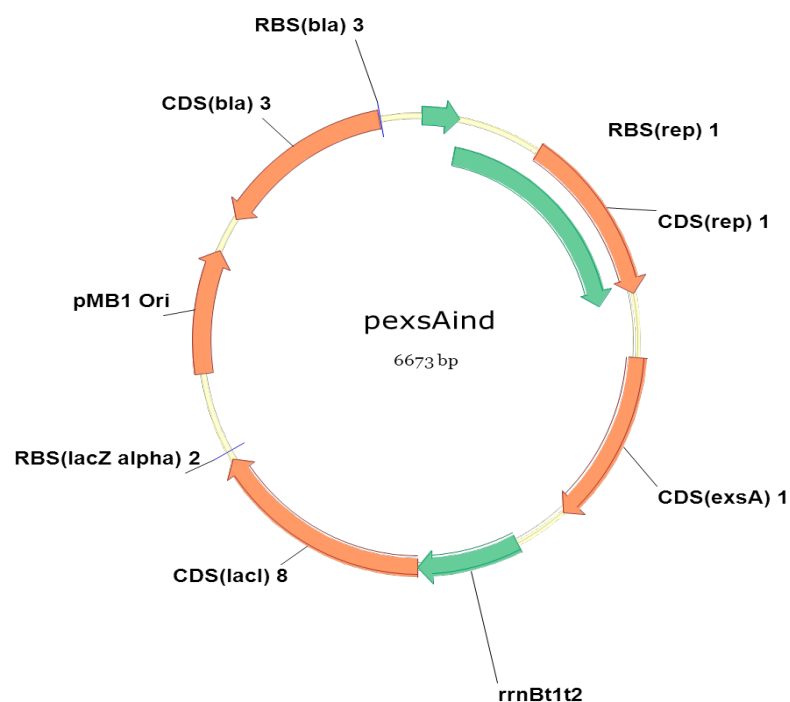
**Figure 20 : Autorépression du SSTT.** (a) L'expression du SSTT est dépendante de la densité cellulaire. La souche sauvage CHA contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* ou *pClux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en conditions d'activation du SSTT. L'activité des promoteurs pS et pC a été mesurée par luminescence (RLU) à différents temps au cours de la croissance (lignes continues, axe de gauche). La densité optique (OD<sub>600</sub>) des cultures a été mesurée (lignes discontinues, axe de droite). ○ : CHA(*pClux*), ▼ : CHA(*pSlux*). (b) La production du PARST est indépendante du QS. La souche sauvage CHA(*pClux*) a été cultivée à 37°C dans le LB en conditions d'activation du SSTT, supplémenté ou non d'un surnageant de phase stationnaire issu des souches CHA, *ΔlasI*, *ΔrhII*, *ΔlasI-rhII* or *ΔrpoS*. — : milieu supplémenté avec du VB. La luminescence a été mesurée à une DO<sub>600</sub> de 1,7. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. Condition d'induction du SSTT : 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>. (Shen *et al.*, 2008)

### 1. Le mode d'action du PARST

Les résultats précédents ont montré que le PARST bloque la transcription des gènes du SSTT. Or, la transcription et la sécrétion sont couplées (Urbanowski *et al.*, 2005). Donc, le PARST inhibe-t-il aussi la sécrétion des exotoxines ?

ExsA est l'activateur transcriptionnel de l'ensemble des gènes du SSTT. Cette protéine est la pièce maîtresse dans la régulation de ce système. De ce fait, nous avons décidé de vérifier si le PARST agit en amont ou en aval de l'action d'ExsA.

Nous avons préparé deux souches rapportrices : *CHA(pSlux)::pexsAind* et *CHA(pClux)::pexsAind*. Elles contiennent le plasmide *pexsAind* (Filopon *et al.*, 2006) qui est inductible à l'IPTG. Il permet une expression *en trans* de la protéine ExsA (figure 21). Ces deux souches rapportrices permettent de mesurer l'activité transcriptionnelle des deux gènes *exoS* et *exsA* par mesure de la bioluminescence émise par les bactéries possédant l'opéron *luxCDABE*. En effet, Les promoteurs de l'opéron *exsCEBA* et du gène *exoS* ont été fusionnés en amont de l'opéron *luxCDABE* sans promoteur. Chacune des fusions transcriptionnelle a ensuite été intégrée dans le chromosome de la souche *CHA* (cf. § III. 11. de la partie matériel et méthodes). Des unités relatives de luminescence rapportées à la  $DO_{600}$ , permettent d'estimer l'activité transcriptionnelle du promoteur.



**Figure 21 : Le plasmide *pexsAind*.** Le plasmide *pexsAind* permet une expression *en trans* de l'activateur transcriptionnel ExsA. Cette expression est sous le contrôle du promoteur *placZ* inductible à l'IPTG. Le gène *bla* permet une résistance à la carbiniciline (Filopon *et al.*, 2006).

Afin d'analyser les effecteurs du SSTT par SDS-PAGE, une culture de 16 heures de chacune des deux souches a été lavée deux fois, le milieu LB a été inoculé à une  $DO_{600}$  de 0,2.



Les bactéries ont été cultivées en présence de la carbéniciline à 300 µg/mL et dans les conditions d'induction du SSTT (5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Différentes conditions ont été testées :

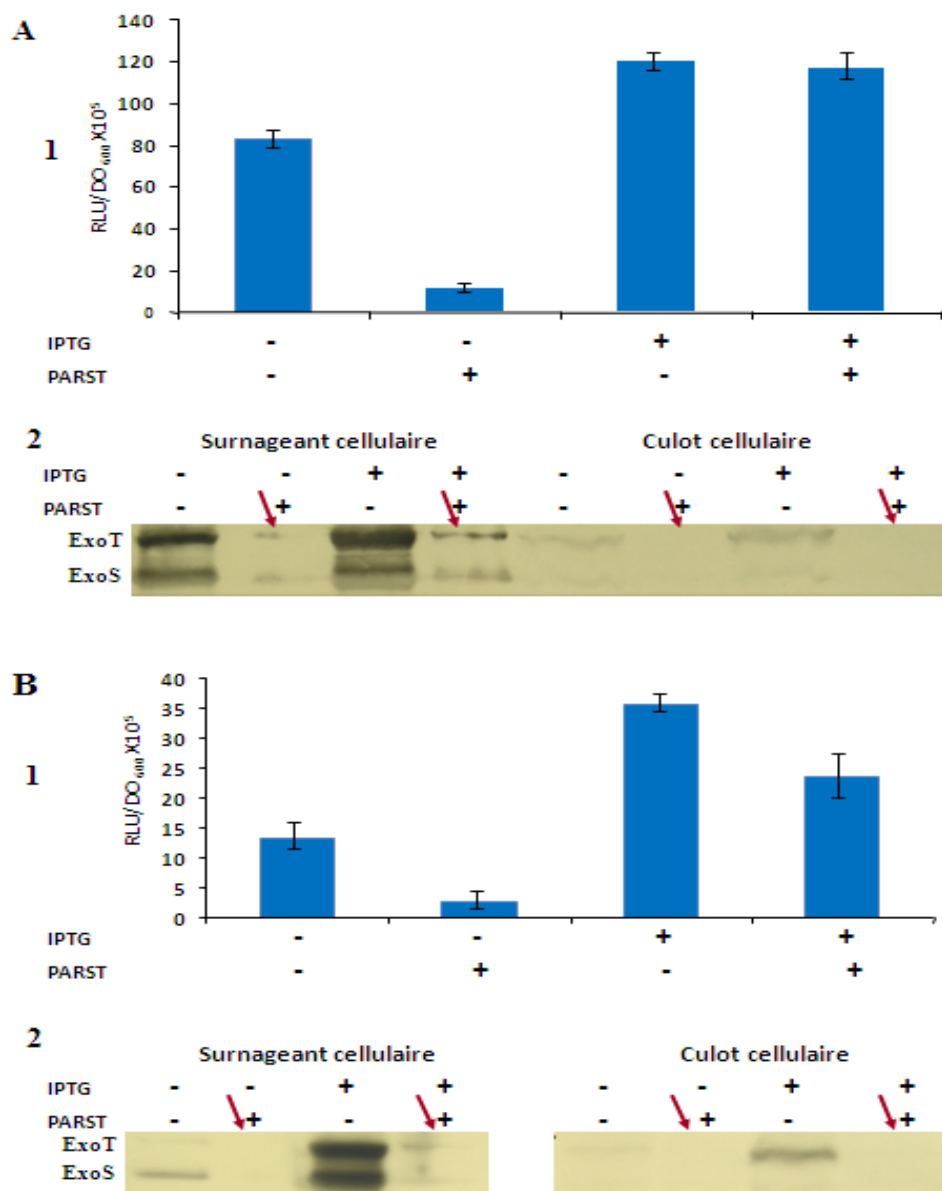
- Présence ou non du PARST (surnageant issu d'une culture de la souche sauvage CHA en phase stationnaire de croissance)
- Induction ou non à l'IPTG (5mM) du facteur de transcription ExsA

Après 3 heures de cultures (DO<sub>600</sub> entre 1,5 et 2), la luminescence a été mesurée et les surnageants ont été récupérés. Une précipitation à l'acide perchlorique à 15% a été réalisée comme décrit dans la partie matériel et méthodes (cf. § 4. 3. 1.). Par une centrifugation de 15 minutes à 15000g, les protéines ont été collectées. Après deux lavages à l'acétone, les protéines ont été séchées et resuspendues dans le tampon de dépôt du SDS-PAGE. Après dénaturation à 95°C, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE à 12%. La quantité des protéines déposées a été normalisée par rapport à la DO<sub>600</sub> de la culture. Les protéines du culot bactérien ont été aussi analysées. En utilisant un anticorps anti-ExoS/ExoT, des Western blots ont été réalisés afin de détecter l'exotoxine S et/ou T dans les échantillons analysés (surnageant et culot).

La figure 22 (A.1 et B.1) montre qu'en absence d'IPTG le PARST inhibe la transcription des gènes du SSTT. L'ajout d'IPTG est à l'origine d'une forte activité transcriptionnelle. Pour la souche CHA(*pClux*)::pexsAind, en présence du PARST, cette activité reste intacte. Cependant, pour la souche CHA(*pSlux*)::pexsAind, cette activité est moins forte -en présence du PARST- mais reste largement supérieure (200%) par rapport à celle obtenue en absence simultanée d'IPTG et du PARST.

En utilisant un anticorps anti-ExoS/ExoT, une immunodétection des exotoxines ExoS et ExoT a été réalisée sur les protéines du surnageant et du culot bactérien correspondant à chaque condition. Pour les deux souches, les résultats (A. 2 et B. 2) montrent que :

- En absence du PARST, les exotoxines sont secrétés dans le surnageant et très peu de protéines sont détectées dans le culot cellulaire
- En présence du PARST (flèches rouges sur la figure), les exotoxines ne sont pas détectées ni dans le surnageant (ou très peu) ni dans le culot cellulaire, ceci même en présence d'IPTG.



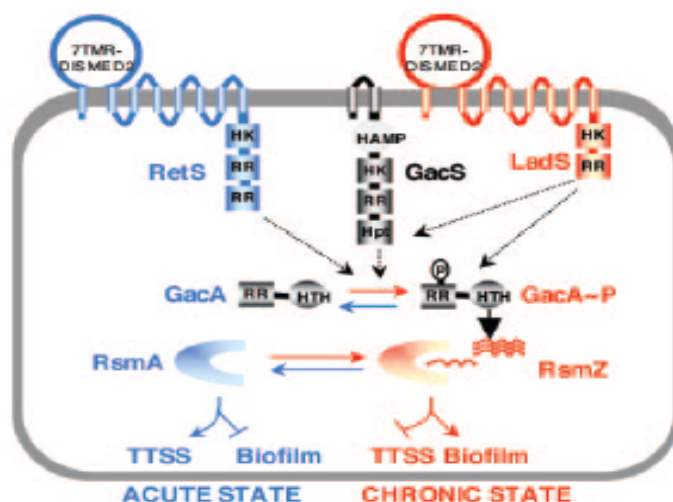
**Figure 22 : Le PARST agit au niveau post-transcriptionnel.** Les souches sauvages *CHA(pClux)::pexsAind* (A) et *CHA(pSlux)::pexsAind* (B) ont été cultivée à 37°C dans le LB sous les conditions d'induction du SSTT (5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Ceci en présence ou non d'IPTG à 5Mm et d'un surnageant (PARST) issu d'une culture en phase stationnaire de la souche *CHA*. La luminescence (RLU) a été mesurée (A. 1 et B. 1) pour une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,5 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. A. 2 et B. 2 : Les surnageants cellulaires ont été précipités au PCA à 15%. Les protéines des surnageants et des culots cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE à 12% après une normalisation. En utilisant un anticorps anti-ExoS/ExoT, Un wester blot a été réalisé pour détecter les exotoxines S et T aussi bien dans le surnageant que dans le culot cellulaire.

En présence du PARST et d'IPTG simultanément :

- Il y a une forte activité transcriptionnelle des deux gènes *exxA* et *exoS*
- Mais les exotoxines sont absents dans le surnageant et le culot cellulaire

Par conséquent il est possible que le PARST soit à l'origine d'une répression de la traduction et une dégradation des ARNm messagers des protéines du SSTT. Donc le PARST pourrait exercer une régulation post-transcriptionnelle. Ceci en plus d'une inhibition de la transcription des gènes du SSTT.

Afin d'expliquer les mécanismes à l'origine de l'inactivation de certains facteurs de virulence dont le SSTT, plusieurs modèles de régulation post-transcriptionnelle ont été proposés (Ventre *et al.*, 2006, Goodman *et al.*, 2004, Heurlier *et al.*, 2004). Ces modèles font intervenir des systèmes à deux composants employant des petits ARN non codants (cf. partie introduction).



**Figure 23 : Voies régulant les facteurs de virulence au cours d'une transition entre infection aiguë et infection chronique.** Ces voies font intervenir des systèmes à deux composantes (RetS, LadS et GacS/A) et un petit ARN non codant (RsmZ) (Ventre *et al.*, 2006).

En suivant le modèle proposé par Ventre *et al.*, 2006 (figure 23), notre hypothèse est la suivante : comme le PARST est un répresseur du SSTT, il stimule la voie de transduction du signal initiée par le système LadS. Cette voie provoque l'activation du système GacS/GacA qui à son tour stimule la formation du petit ARN non codant RsmZ. Ce dernier se lie à la protéine RsmA qui est une protéine se liant aux petits ARN non codants. RsmY est un autre petit ARN non codant qui peut aussi interagir avec la protéine RsmA (Valverde *et al.*, 2003).

---

Cette liaison entre RsmZ ou RsmY et RsmA est à l'origine d'une déstabilisation des ARNm issus de la transcription des gènes du SSTT.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de préparer des souches rapportrices avec délétion dans l'un des gènes suivants : *ladS*, *retS*, *gacS*, *gacA*, *rsmZ*, *rsmY* et *rsmA*. Malheureusement après plusieurs essais, nous n'avons pas pu obtenir les mutants appropriés. D'autre part, ces mutants ont été utilisés par d'autres équipes de recherche, mais nous n'avons pas pu les avoir. De ce fait, nous avons commandé auprès de l'Université de Washington ([www.gs.washington.edu](http://www.gs.washington.edu), [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), la souche sauvage MPAO1 et les mutants de transposition : PAO1Δ*gacA*, PAO1Δ*gacS*, PAO1Δ*retS* et PAO1Δ*ladS*. Bien que ces souches possèdent tous les gènes codant pour le SSTT, l'induction de ce dernier s'est avérée très faible ou presque nulle. Il est possible que le SSTT de ces souches est non inductible car beaucoup de souches perdent cette inductibilité par des mécanismes épigénétique (cf. partie introduction, chapitre 3, § 9. 2. 1.).

À l'issue de cette première série de travaux, nous avons constaté que le PARST exerce une régulation de l'expression du SSTT de type post-transcriptionnelle. En effet, les gènes du SSTT sont transcrits mais les ARNm ne sont pas traduits et sont probablement dégradés. Il est possible que le récepteur du signal PARST soit la protéine LadS car la voie médiée par cette dernière est à l'origine d'une inactivation du SSTT.

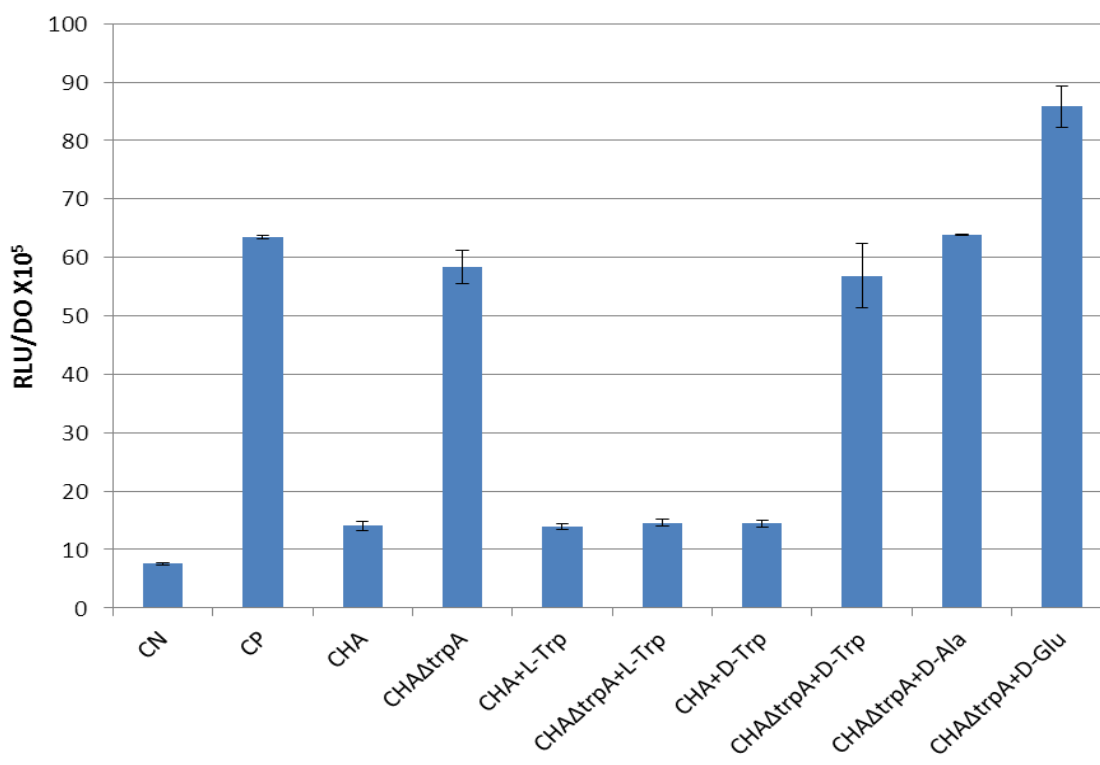
## 2. La caractérisation du PARST

Les études effectuées au laboratoire (Shen *et al.*, 2008) indiquent que le signal d'autorépression est composé d'un ou plusieurs catabolites du tryptophane. Pour la caractérisation de ce signal nous avons suivi deux approches :

1. Une approche génétique : des gènes des voies de biosynthèse des catabolites du tryptophane ont été inactivés par insertion/délétion au moyen du système *cre-lox* optimisé dans notre laboratoire (Quénéé *et al.*, 2005) et l'activité d'autorépression de chaque mutant a été vérifiée ;
2. Une approche chimique : consiste à purifier et caractériser le signal par CLHP/MS.

## 2. 1. La production du PARST dépend du L-tryptophane

Les êtres vivants utilisent essentiellement les L-amino acides pour leur métabolisme. Pour la plupart des bactéries, les seuls D-amino acides produits sont le D-Alanine et le D-Glutamate. Selon Lam et ses collaborateurs (Lam *et al.*, 2009) les bactéries produisent divers D-amino acides au cours de la phase stationnaire de croissance. Ils ont montré que ces D-amino acides régulent négativement la synthèse du peptidoglycane et ralentissent la croissance d'une culture en phase exponentielle.



**Figure 24 : Le L-tryptophane et non le D-tryptophane est impliqué dans la production du PARST.** La souche sauvage CHA(*pSlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence de surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance. Ces surnageants ont été préparés dans le milieu VB (CHA et CHAΔtrpA) ou dans le VB supplémenté avec 200 µg/mL du : L-tryptophane (CHA+L-Trp, CHAΔtrpA+L-Trp), D-tryptophane (CHA+D-Trp, CHAΔtrpA+D-Trp), du D-alanine (CHAΔtrpA+D-Ala) ou du D-glutamate (CHAΔtrpA+D-Glu). La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée pour une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,6 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

---

Il a été démontré que la production du PARST dépend du L-tryptophane (Shen *et al.*, 2008) et comme le PARST est produit en phase stationnaire de croissance, nous avons testé l'implication du D-tryptophane dans la production de ce signal d'autorépression. Deux autres D-amino acides ont été également testés : le D-alanine et le D-glutamate.

Des surnageants de culture en milieu contenant les D-amino acides ont été préparés pour la souche sauvage CHA et le mutant CHA $\Delta$ *trpA*. Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures en milieu LB de la souche rapportrice CHA(*pSlux*) inoculée à une DO<sub>600</sub> initiale de 0,05. Ceci dans les conditions d'induction du SSTT.

Contrairement à la souche sauvage, le surnageant issu du mutant CHA $\Delta$ *trpA* perd la capacité d'inhiber l'expression du promoteur *pS* (promoteur du gène *exoS*) et donne le même profil par rapport au contrôle positif dans lequel le surnageant a été remplacé par le milieu VB (figure 24). La complémentation du mutant  $\Delta$ *trpA* par ajout de 200  $\mu$ g/mL du L-tryptophane, pendant la préparation du surnageant, restaure l'activité d'inhibition. Par contre l'ajout du D-tryptophane, du D-alanine ou du D-glutamate pendant la préparation du surnageant ne restaure pas l'activité d'inhibition du surnageant issu du mutant CHA $\Delta$ *trpA*.

Ces résultats confirment le fait que la production du PARST dépend du tryptophane et indiquent que la production de ce signal d'autorépression est isomère dépendante.

## 2. 2. Approche génétique : la/les voies impliquées dans la production du PARST

Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que la production du PARST est dépendante du tryptophane (Shen *et al.*, 2008). La figure 25 montre les différentes voies impliquées dans la dégradation du tryptophane chez *P. aeruginosa*. Nous avons décidé de refaire un point exhaustif sur l'ensemble du métabolisme du tryptophane chez *P. aeruginosa* à partir des données de la littérature et des bases de données du métabolisme.

La figure 25 montre que le tryptophane est le précurseur de nombreuses molécules. Il est impliqué dans la biosynthèse des auxines : l'acide indole-3-acétique (AIA) et le 5-hydroxy-AIA. Deux voies de production des auxines sont connues chez les bactéries. La voie de l'indole-3-acétamide (IAM) et celle de l'indole-3-pyruvate (IPA) (Lambrecht *et al.*, 2000). Chez *P. syringae*, la tryptophane monooxygénase (IaaM) transforme le tryptophane en IAM, et une IAM hydrolase (IaaH) transforme l'IAM en AIA (Patten and Glick, 1996). Chez *P. putida* le gène *ipdC* codant une indole pyruvate décarboxylase est le gène clé de la synthèse de l'AIA (Patten and Glick, 2002). Chez *P. aeruginosa*, une aldéhyde déshydrogénase codée

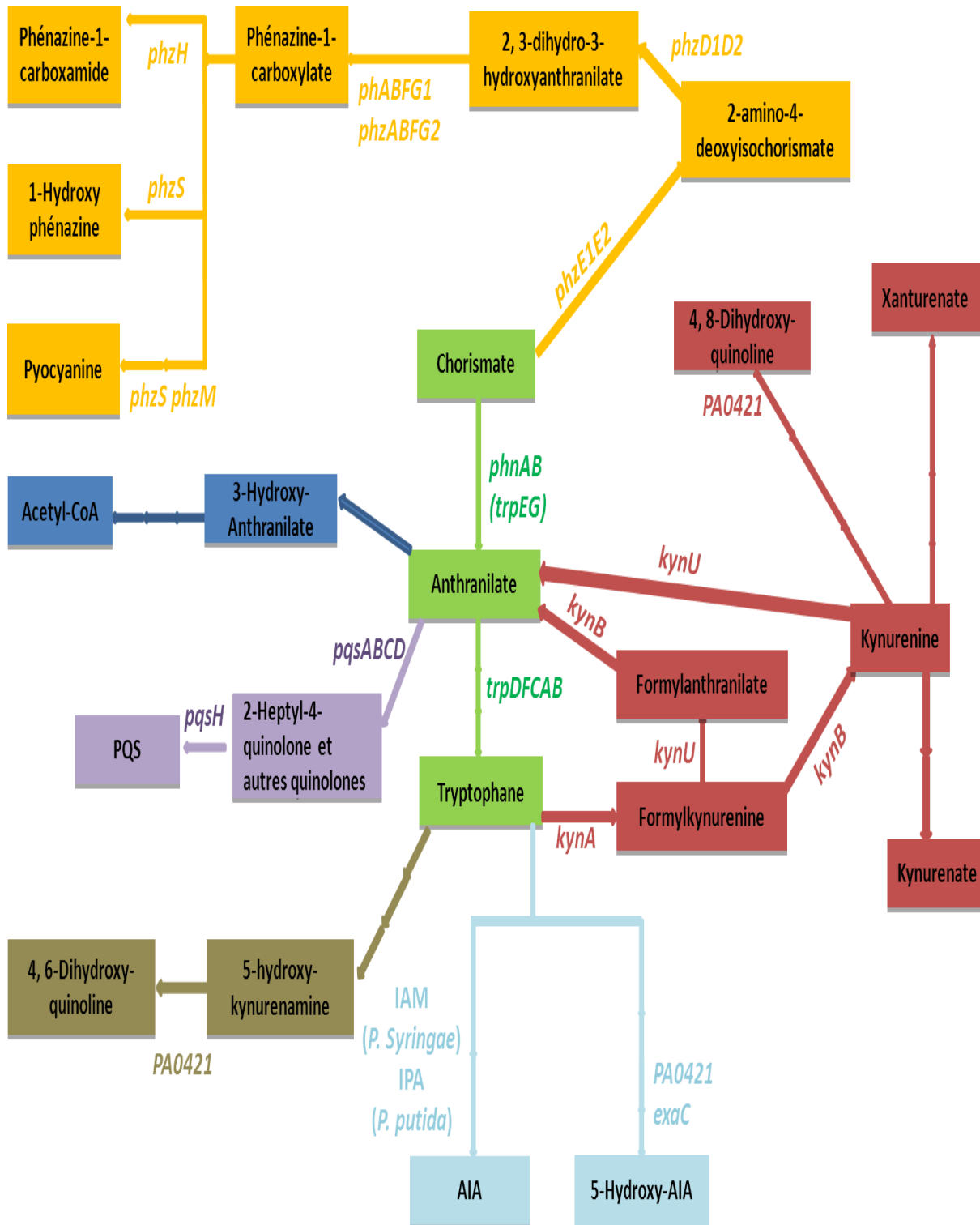


Figure 25 : Métabolisme du tryptophane chez *Pseudomonas* spp.

par le gène *exaC* (PA1027) est impliquée dans la synthèse du 5-Hydroxy-AIA. La fonction de la protéine codée par le gène *PA0421* n'est pas encore connue néanmoins elle a une

homologie avec des amine oxidases de *P. aeruginosa* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) et avec la monoamine oxidase B humaine.

Le tryptophane est aussi impliqué dans la biosynthèse des kynurénines. Chez *P. aeruginosa*, la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) codée par le gène *kynA* (PA2579) et la kynurenine formamidase codée par le gène *kynB* (PA2081), sont nécessaires pour la production des kynurénines (Farrow and Pesci, 2007; Kurnasov *et al.*, 2003a; Kurnasov *et al.*, 2003b). La kynureninase codée par le gène *kynU* (PA2080) transforme la kynurénine en anthranilate. Via l'anthranilate, le tryptophane donne :

- Le PQS (Pseudomonas quinolone signal) : l'opéron *pqsABCD* code 3 synthases et une ligase probable. Le gène *pqsH* semble coder une monooxygénase (Farrow and Pesci, 2007)
- L'acétyl-coA (Calfee *et al.*; 2001; Knoten *et al.*, 2011).

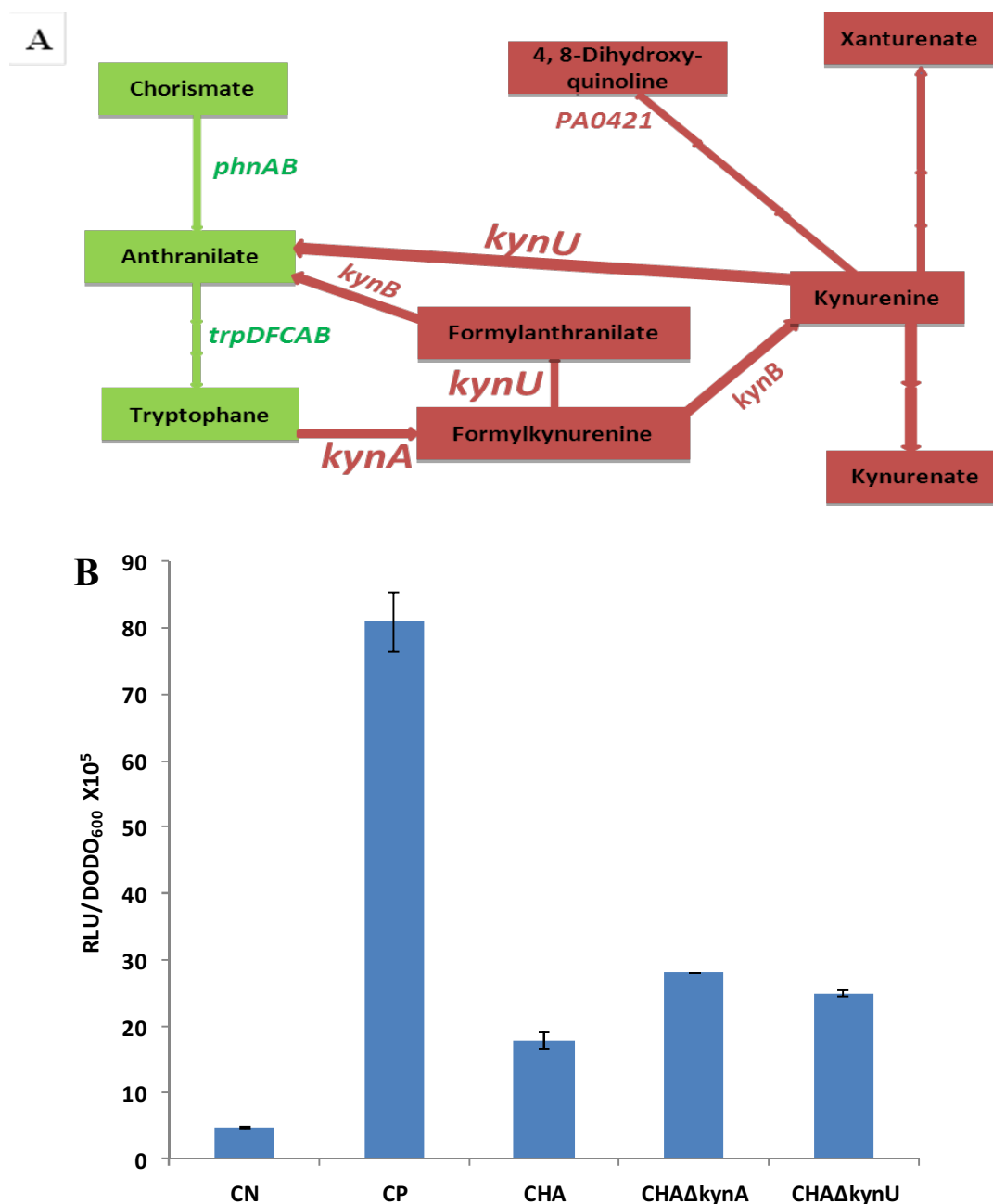
Le tryptophane peut aussi être dégradé en quinolone. Le chorismate est le précurseur du tryptophane. L'opéron *phnAB* (ou *trpEG*) code les deux sous-unités de l'anthranilate synthase. L'opéron *trpDFCAB* code les enzymes de biosynthèse du tryptophane dont la tryptophane synthase (*trpA*). La dégradation du chorismate donne des phénazines tel que la Phénazine-1-carboxylate. En effet, il existe deux voies parallèles pour la synthèse des phénazines et les protéines impliquées sont codées par l'opéron *phzABFG1*, *phzABFG2*, *phzE1E2*, le gène *phzD1*, *phzS* et *phzH* ([www.genome.jp](http://www.genome.jp), [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com); [www.metacyc.org](http://www.metacyc.org)).

### 2. 2. 2. La voie des kynurénines est partiellement impliquée dans la production du PARST

Afin de déterminer la/les voies du catabolisme du tryptophane impliquées dans la production du PARST, des mutants de délétion ont été préparés par échange allélique comme décrit dans la partie matériel et méthodes.

Dans un premier temps, ce sont les deux gènes *kynA* et *kynU* (figure 26. A) qui ont été invalidés. Le gène *kynA* code la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). C'est l'enzyme clé de la voie des kynurénines. Elle transforme le tryptophane en N-formylkynurenine. Le gène *kynU* code une kynuréninase convertissant la kynurénine en anthranilate (Farrow *et al.*, 2007; Kurnasov *et al.*, 2003a; Kurnasov *et al.*, 2003b). La caractérisation de ces mutants et en particulier le fait que le mutant  $\Delta kynA$  ne produise pas de kynurénines sera exposée en détail





**Figure 26 : La production du PARST ne dépend pas que de la voie des kynurénines. A)**

Partie du catabolisme du tryptophane montrant la voie des kynurénines avec les deux gènes *kynA* et *kynU* (pour plus de détails, voir la figure 25). B) La souche sauvage CHA(*pSlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence de surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance des souches CHA, CHAΔ*kynA* et CHAΔ*kynU*. Ces surnageants ont été préparés dans le VB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

---

dans le prochain chapitre.

Des surnageants de phase stationnaire de croissance ont été préparés pour la souche sauvage CHA et les deux mutants  $CHA\Delta kynA$  et  $CHA\Delta kynU$ . Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures de la souche rapportrice  $CHA(pSlux)$  inoculée à une  $DO_{600}$  initiale de 0,05 dans du milieu LB sous les conditions d'induction du SSTT.

La délétion du gène *kynA* ou *kynU* est à l'origine d'une faible diminution de la répression du SSTT. Le surnageant issu de chacun des deux mutants garde en grande partie la capacité d'inhiber l'expression du promoteur *pS* (promoteur du gène *exoS*). Cette répression n'est que faiblement inférieure par rapport à celle de la souche sauvage CHA (figure 26. B).

Ces résultats indiquent que la voie des kynurénines n'est probablement que partiellement impliquée dans la production du PARST. Donc, il existe d'autres voies du catabolisme du tryptophane qui sont directement impliquées dans la production de ce signal.

### 2. 2. 3. La production du PARST ne dépend pas de la voie du PQS

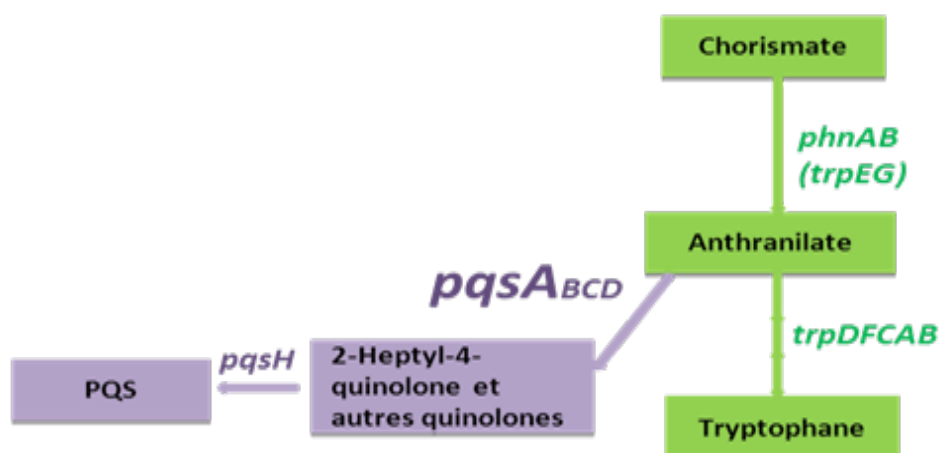
Pour mettre en œuvre une implication ou non de la voie du PQS dans la production du PARST, le mutant  $\Delta pqsA$  a été testé. Le gène *pqsA* code une synthase de la voie du PQS (figure 27. A).

Des surnageants de phase stationnaire de croissance ont été préparés pour la souche sauvage PAO1 et le mutant  $PAO1\Delta pqsA$ . Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures de la souche rapportrice  $CHA(pSlux)$  inoculée à une  $DO_{600}$  initiale de 0,05 dans du milieu LB et sous les conditions d'induction du SSTT.

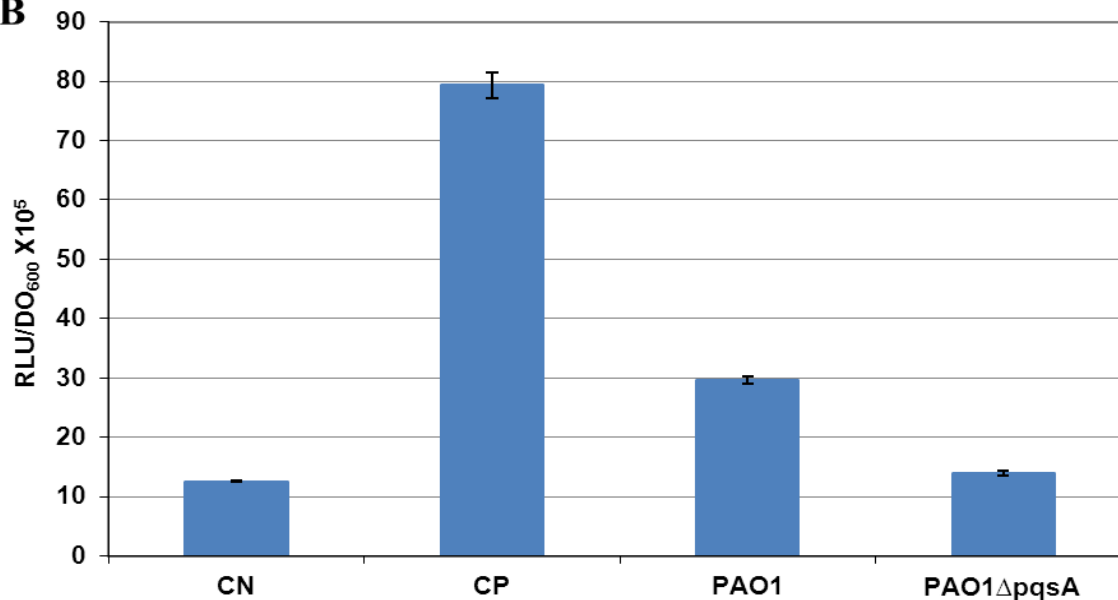
La figure 27. B montre que la délétion du gène *pqsA* est à l'origine d'une répression plus forte, par rapport à la souche sauvage. En effet, le surnageant issu du mutant  $\Delta pqsA$  non seulement garde la capacité d'inhiber l'expression du gène *exoS*, mais il exerce une répression supérieure par rapport à celle de la souche sauvage PAO1.

Ces résultats indiquent que la voie du PQS n'est pas impliquée dans la production du PARST. Mais probablement un ou des métabolites de cette voie notamment l'antranilate pourrait servir pour la production de ce signal. Ceci est compatible avec des résultats précédents indiquant que le PQS ne correspond pas au PARST (Dakang Shen, Thèse de l'université Joseph Fourier, 2006).

A



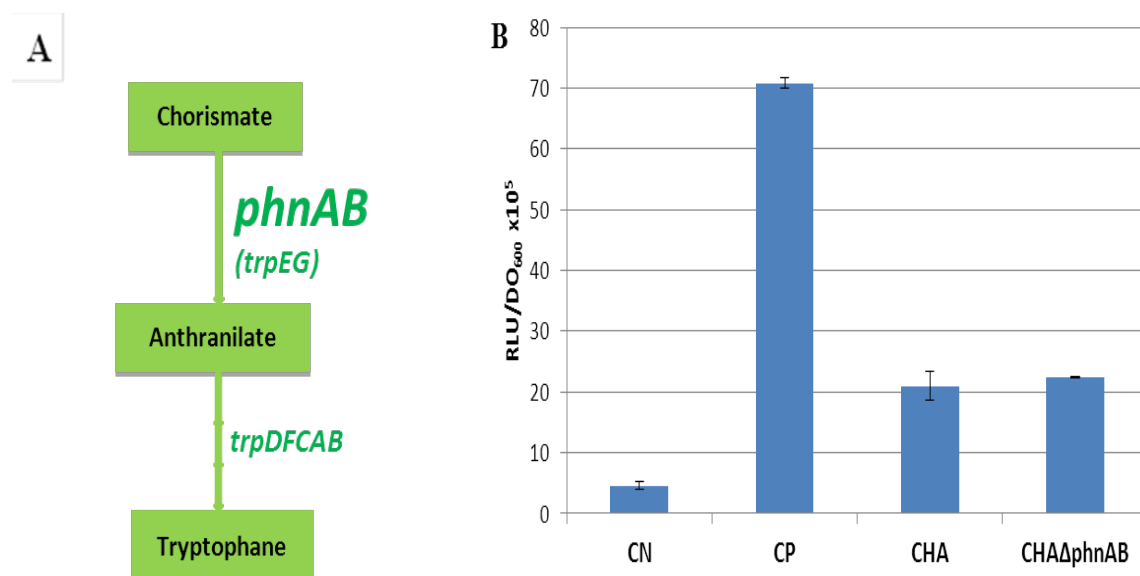
B



**Figure 27 : La production du PARST ne dépend pas de la voie du PQS.** A) Partie du catabolisme du tryptophane montrant la voie du PQS avec le deux gènes *pqsA* (pour plus de détails, voir la figure 25). B) La souche sauvage CHA(*pSlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence des surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance de la souche sauvage PAO1 et le mutant PAO1Δ*pqsA*. Ces surnageants ont été préparés dans le VB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

#### 2. 2. 4. La délétion de l'opéron *phnAB* n'a pas d'effet sur la production du PARST

L'opéron *phnAB* code les deux sous-unités de l'antranilate synthase. L'implication de cet opéron dans la production du PARST a été vérifiée dans le mutant  $CHA\Delta phnAB$  (figure 28).



**Figure 28 : L'opéron *phnAB* n'est pas impliqué dans la production du PARST.** A) Partie du métabolisme du tryptophane montrant l'opéron *phnAB* (pour plus de détails, voir la figure 25). B) La souche sauvage  $CHA(pSlux)$  contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence de surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance de la souche sauvage  $CHA$  et le mutant  $CHA\Delta phnAB$ . Ces surnageants ont été préparés dans le VB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la  $DO_{600}$  et les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du  $CaCl_2$ ), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM  $MgCl_2$ ).

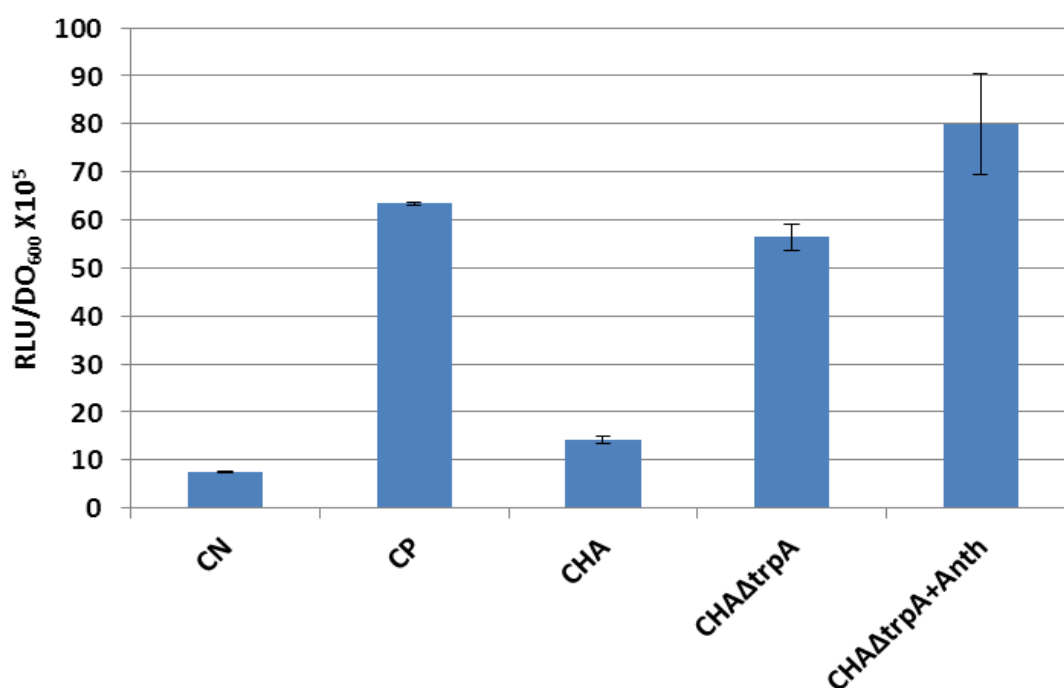
Des surnageants de phase stationnaire de croissance ont été préparés pour la souche sauvage  $CHA$  et le mutant  $CHA\Delta phnAB$ . Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures de la souche rapportrice  $CHA(pSlux)$  inoculée à une  $DO_{600}$  initiale de 0,05 dans du milieu LB sous les conditions d'induction du SSTT.

Le surnageant issu du mutant  $CHA\Delta phnAB$  inhibe l'expression du gène *exoS* autant que celui issu de la souche sauvage. La délétion de l'opéron *phnAB* n'a alors pas d'effet sur la production du PARST (figure 28. B). Par conséquent, l'opéron *phnAB* n'est pas nécessaire pour la production de ce signal.

L'opéron *phnAB* code pour les deux sous-unités de l'antranilate synthase (figure 25). Cette enzyme transforme le chorismate en antranilate. Ce dernier donne à son tour le tryptophane. Comme la production du PARST dépend du tryptophane, la délétion de l'opéron *phnAB* devait être à l'origine d'une disparition du signal PARST comparable à celle observée pour le mutant *CHAΔtrpA*. Mais ce n'était pas le cas. Ceci pourrait être expliqué par l'existence d'autres voies inconnues et importantes de biosynthèse de l'antranilate ou d'un autre métabolite précurseur du tryptophane.

### 2. 2. 5. L'antranilate et la production du PARST

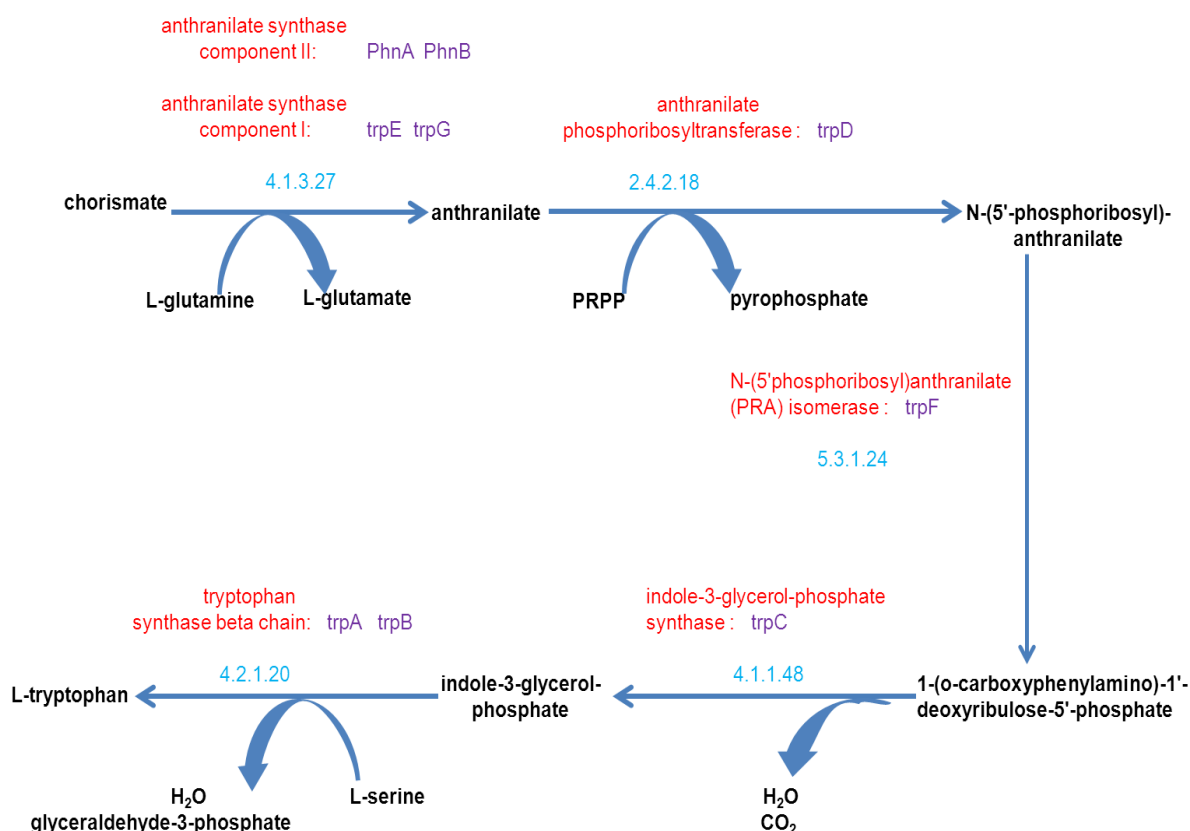
À partir des résultats obtenus pour les mutants  $\Delta phnAB$  et  $\Delta pqsA$ , nous avons émis l'hypothèse que l'antranilate pourrait être impliqué dans la production du PARST.



**Figure 29 : L'antranilate n'inhibe pas l'expression du SSTT.** La souche sauvage *CHA(pSlux)* contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence de surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance. Ces surnageants ont été préparés dans le VB (*CHA* et *CHAΔtrpA*), dans le VB supplémenté avec de l'antranilate à 1mM (*CHAΔtrpA*+Anth). La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée entre une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,6 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

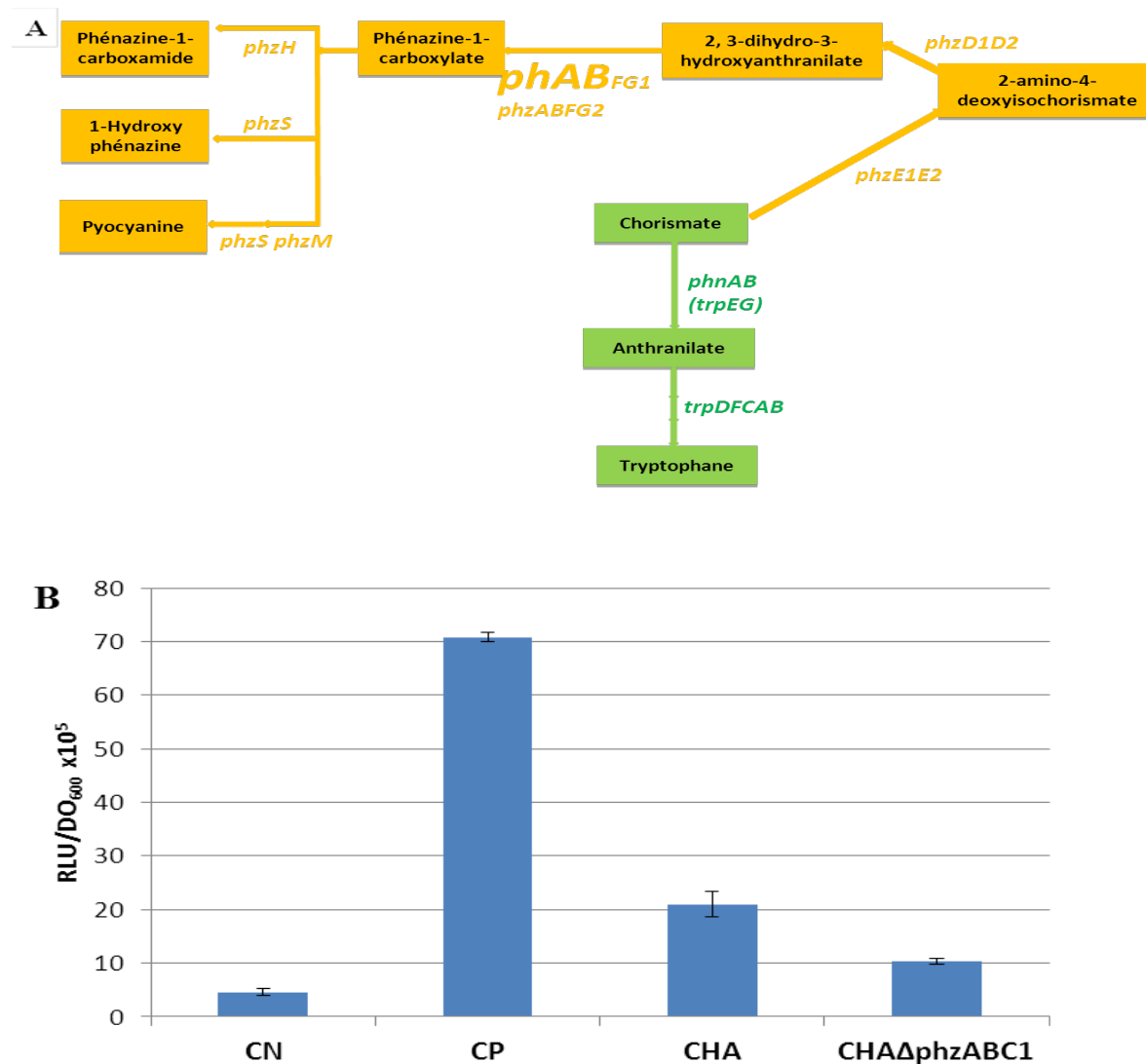
Des surnageants de phase stationnaire de croissance ont été préparés pour la souche sauvage CHA et le mutant  $\Delta trpA$  dans lequel on ajoute de l'antranilate pour une éventuelle restauration de la production du PARST. Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures de la souche rapportrice CHA(*pSlux*) inoculée à une  $DO_{600}$  initiale de 0,05 dans le milieu LB sous les conditions d'induction du SSTT.

Comme déjà démontré, le surnageant issu du mutant  $\Delta trpA$  perd la capacité d'inhiber l'expression du gène *exoS* et donne le même profil par rapport au contrôle positif dans lequel le surnageant a été remplacé par le milieu VB (figure 29). La complémentation du mutant  $\Delta trpA$  par ajout d'antranilate à 1mM dans le milieu VB, pendant la préparation du surnageant, ne restaure pas l'activité d'inhibition. Ces résultats ne permettent pas d'annuler une éventuelle implication de l'antranilate dans la production du PARST car il donne l'indole-3-glycerol-phosphate (figure 30). Ce dernier donne le tryptophane suite à l'action de la tryptophane synthase, codée par les deux gènes *trpA* et *trpB*.



**Figure 30 : Voie de biosynthèse du tryptophane chez *P. aeruginosa* PAO1.** Les chiffres représentent des liens vers la base de données ExPASy (<http://web.expasy.org>), PRPP : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

## 2. 2. 6. La voie des phénazines est probablement impliquée dans la production du PARST



**Figure 31 : La voie des phénazines est probablement impliquée dans la production du PARST.** A) Partie du catabolisme du tryptophane montrant la voie des phénazines (pour plus de détails, voir la figure 25). B) La souche sauvage CHA(*pSlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pSlux* dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence de surnageants issus de cultures en phase stationnaire de croissance de la souche sauvage CHA et le mutant CHAΔ*phzABC1*. Ces surnageants ont été préparés dans le VB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

---

Afin de vérifier si la voie des phénazines (figure 31. A) est impliquée dans la production du PARST, trois gènes de la première voie des phénazines : *phzA1*, *phzB1* et *phzC1* ont été invalidés (le gène *phzC1* ne figure pas sur la voie). Les deux protéines codées par les gènes *phzA1* et *phzB1* n'ont pas encore été caractérisées mais il est probable qu'elles soient impliquées dans la biosynthèse des phénazines. La protéine PhzC codée par le gène *phzC1* est bien impliquée dans la biosynthèse des phénazines. Le gène *phzC1* fait partie de l'opéron renfermant les deux gènes *phzA1* et *phzB1*.

Des surnageants de phase stationnaire de croissance ont été préparés pour la souche sauvage CHA et le triple mutant CHA $\Delta$ *phzABC1*. Ces surnageants ont été appliqués sur des cultures de la souche rapportrice CHA(*pSlux*) inoculée à une DO<sub>600</sub> initiale de 0,05 dans du milieu LB sous les conditions d'induction du SSTT.

Le surnageant issu du mutant CHA $\Delta$ *phzABC1* réprime l'expression du gène *exoS* (figure 31. B). Cette répression est même plus forte que celle causée par la souche sauvage. Il est donc possible que l'un ou les deux métabolites : le 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilate et le 2-amino-4-deoxyisochorismate puissent servir pour la production du PARST. Il est également possible que l'un des deux soit le PARST. Afin de mesurer l'activité PARST de ces deux molécules, nous avons essayé de nous les procurer sans succès pour l'instant.

L'ensemble de ces résultats indique que le L-tryptophane est le précurseur du signal PARST. Chez *P. aeruginosa* cet acide aminé est synthétisé à partir du chorismate en passant par l'anthranilate. Ce dernier donne le tryptophane grâce à l'action de l'enzyme codée par le gène *trpA* dont l'inactivation est à l'origine d'une perte de l'activité d'autorépression. Bien que l'anthranilate soit un métabolite de la voie des kynurénines, la participation de cette voie dans la production du PARST est très faible. Donc, d'autres voies, plus importantes, sont impliquées dans la production du PARST. La délétion des trois gènes *phzA1*, *phzB1* et *phzC1* est à l'origine d'une augmentation de l'activité PARST. Il est possible que les deux Métabolites accumulés : le 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilate et le 2-amino-4-deoxyisochorismate peuvent donner le chorismate qui, à son tour, donnera le tryptophane et le PARST. L'enzyme codée par l'opéron *phnAB* transforme le chorismate en anthranilate. Cependant, l'inactivation de cet opéron n'a pas d'effet sur l'activité PARST. Il existe donc une ou des voies inconnues de biosynthèse de tryptophane. Ces voies sont responsables de la production d'une grande partie du signal PARST.



---

## 2. 3. Approche chimique

Les résultats ci-dessus plus ceux obtenus par Dakang Shen (Shen *et al.*, 2008) ont montré d'une part que différentes voies sont impliquées dans la production du PARST et d'autre part que ce dernier pourrait être composé d'une ou plusieurs molécules qui sont des catabolites du tryptophane.

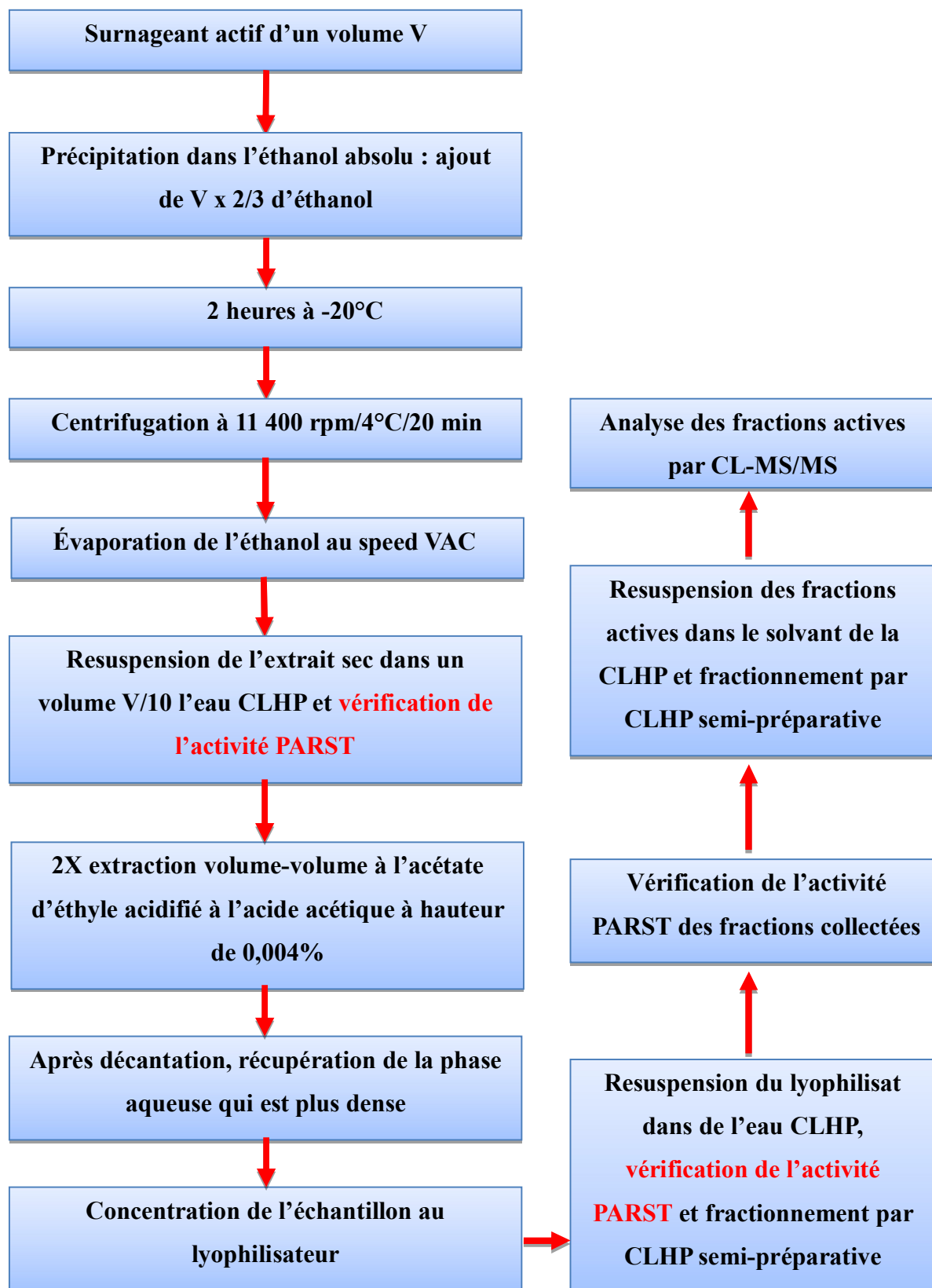
Afin de caractériser le signal PARST, nous avons développé un protocole de purification en vue de l'identification de ce signal par ESI-LC/MS.

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) de l'Université de Bretagne-Sud (UBS) à Lorient.

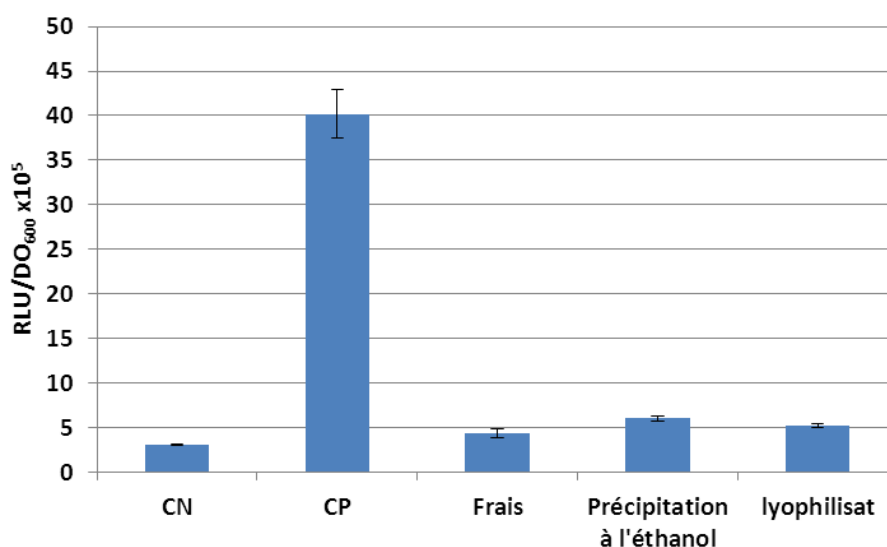
### 2. 3. 1. Validation du protocole de caractérisation du signal PARST

Un surnageant de phase stationnaire de croissance a été préparé et vérifié pour son activité de répression comme décrit dans la partie matériel et méthodes (cf. § 4. 5. 1. et 4. 5. 2.). La purification comprend de nombreuses étapes de centrifugation, filtration, extractions successives à l'éthanol puis à l'acétate d'éthyle acidifié. Les molécules constitutives du signal d'autorépression étant polaires, elles sont recueillies dans la phase aqueuse puis concentrées par lyophilisation. La figure 32 montre l'ensemble des étapes du protocole.

Afin de vérifier la pertinence de l'approche analytique développée, nous avons vérifié l'activité PARST du surnageant traité à différents niveaux du protocole de purification. La figure 33 indique que le signal d'autorépression n'est pas sensible aux solvants utilisés dans les différentes étapes d'extraction et purification. De plus, l'utilisation de ces solvants n'empêche pas de détecter le signal d'autorépression à l'aide du rapporteur biologique CHA(*pSlux*). La stabilité du signal au cours du temps ainsi qu'aux variations de températures et aux multiples manipulations semble suffisante pour mener à bien sa purification et sa caractérisation. De plus, des travaux réalisés en 2007 (Mémoire de Julie Manillier, 2007) ont permis de confirmer une stabilité du PARST vis-à-vis de l'acide trifluoroacétique (TFA) utilisé en chromatographie liquide pour charger les ions et ainsi les séparer selon leur taille. Par conséquent, la stabilité des molécules d'intérêt aux différents traitements et solvants a été validée.



**Figure 32 : Protocole de caractérisation du signal PARST.** La stabilité de l'activité PARST a été vérifiée à différents niveaux du protocole (signalé en rouge).

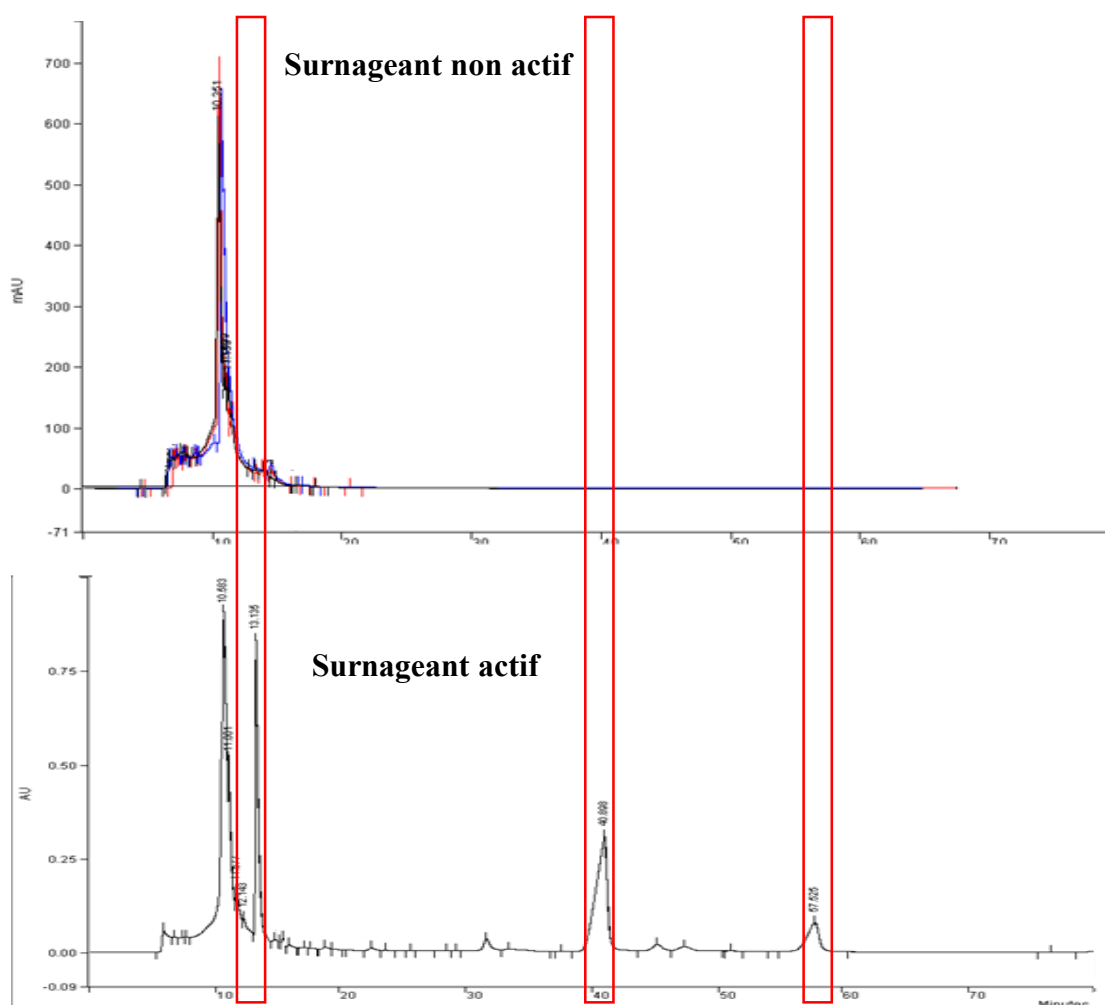


**Figure 33 : Les différents traitements de purification n'affectent pas la stabilité du PARST.** Un surnageant issu d'une culture en phase stationnaire de la souche CHA a été testé pour son activité PARST avant de subir les différents traitements de purification (Frais), après précipitation à l'éthanol (Précipitation à l'éthanol) et après lyophilisation (lyophilisat). La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub>. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

### 2. 3. 2. Fractionnement du surnageant

Afin de récupérer une quantité suffisante de molécules, nous avons mis en place une purification par CLHP semi-préparative en phase inverse (colonne de type C18) avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Le surnageant lyophilisé et concentré 5 fois dans de l'eau CLHP a été alors fractionné. Grâce à un collecteur de fractions, nous récupérons une fraction toutes les 5 minutes. Un détecteur U. V nous a permis de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 280 nm. La figure 34 correspond à deux chromatogrammes de deux surnageants différents, l'un est actif et l'autre non actif. Pour le surnageant actif, il existe trois pic qui sont absents dans le deuxième chromatogramme :

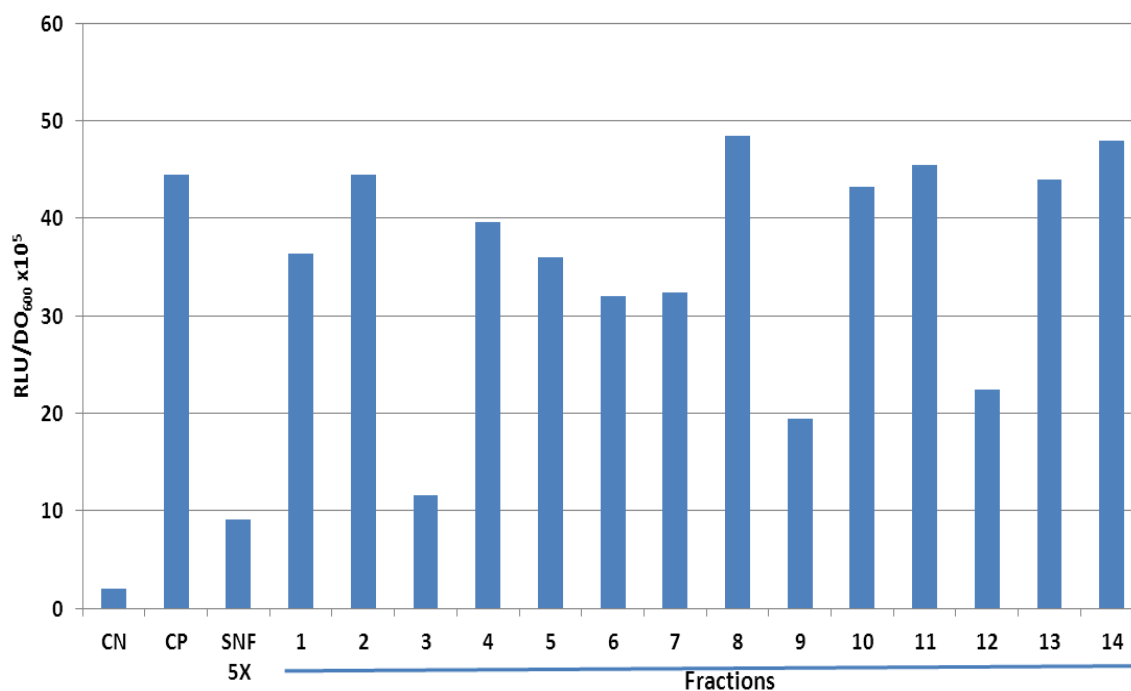
- Le premier pic est élué à 13 minutes. Il correspond à la troisième fraction élue entre 10 et 15 minutes
- Le deuxième est élué à 40 minutes. Il correspond à la neuvième fraction élue entre 40 et 45 minutes
- Le troisième est élué à 57 minutes. Il correspond à la douzième fraction élue entre 55 et 60 minutes



**Figure 34 : Chromatogrammes à 280 nm de deux surnageants actif et non actif.** Deux surnageants actif et non actif ont été fractionnés par CLHP semi-préparative en phase inverse (colonne C18), avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Les fractions ont été collectées toutes les 5 minutes.

Pour chaque fraction collectée, le solvant a été évaporé par Speed-VAC. Le culot est repris dans de l'eau CLHP de sorte que les fractions ont été concentrées 5 fois. Par la suite l'activité PARST de chacune des fractions a été mesurée (figure 35). La fraction 3 est la plus intéressante. Elle est fortement active. Elle réprime à 75% l'activité du promoteur *pS*. Les fractions 9 et 12 sont aussi intéressantes. Elles répriment à 56% et 50% respectivement.

**Remarque :** Le milieu VB a été également fractionné et l'activité PARST des différentes fractions a été évaluée. Pour toutes les fractions, aucune activité de répression du SSTT n'a été détectée.



**Figure 35 : Activité d'autorépression des différentes fractions issu du surnageant actif.**

Le surnageant actif a été fractionné par CLHP semi-préparative en phase inverse (colonne de type C18) avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Les fractions ont été collectées toutes les 5 minutes et elles ont été testées pour leurs activités PARST. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub>. SNF : surnageant non fractionné, 5X : concentré 5 fois, CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

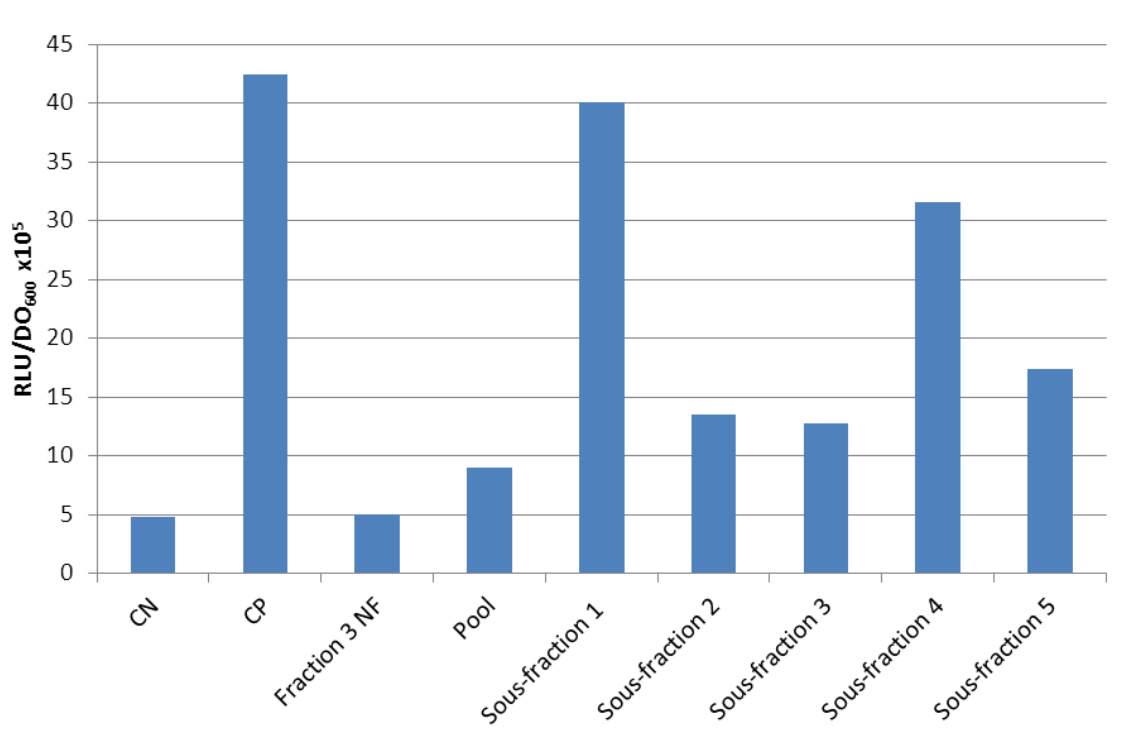
Comme la fraction 3 est la plus active, nous nous sommes focalisés sur cette fraction pour la suite de la caractérisation. Cette fraction a été, à son tour, fractionnée par CLHP semi-préparative en phase inverse. Grâce à un collecteur de fractions, nous récupérons une fraction toutes les 5 minutes. Un détecteur U. V nous a permis de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 280 nm. Pour chaque sous-fraction collectée, le solvant a été évaporé par speed-VAC. Le culot est repris dans de l'eau CLHP de sorte que les sous-fractions ont été concentrées 5 fois et, l'activité PARST de chacune de ces fractions a été mesurée (figure 36).

La figure 36 montre que le pool des 5 sous fractions de la fraction 3 perd un peu de son activité d'autorepression. Ceci est probablement dû aux différentes étapes telles que la CLHP. Concernant les 5 sous fractions et, par rapport au contrôle positif :

- La sous fraction 1 n'a pas d'activité PARST
- La sous fraction 2 a une activité PARST de 68%

- La sous fraction 3 a une activité PARST de 70%
- La sous fraction 4 a une activité PARST de 25%
- La sous fraction 5 a une activité PARST de 58%

La sous fraction 3 est donc la plus active. À partir de ces résultats, il est possible que le PARST soit composé de différentes molécules agissant en synergie.



**Figure 36 : Activité d'autorépression des sous fractions de la fraction 3.** La fraction 3 issue du surnageant actif a été fractionnée par CLHP semi-préparative en phase inverse (colonne de type C18) avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Les fractions ont été collectées toutes les 5 minutes pendant 25 minutes et, elles ont été testées pour leurs activités PARST. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub>. NF : non fractionnée. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

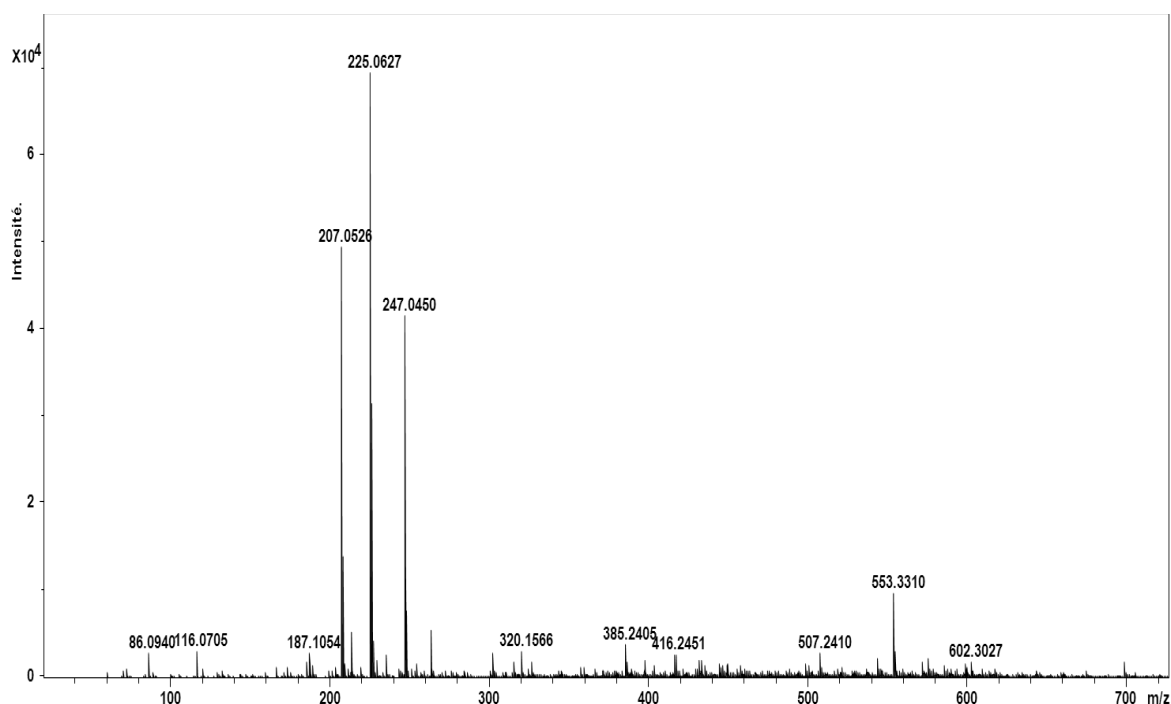
### 2. 3. 3. Tentative d'identification de la/les molécules PARST

La fraction 3 ainsi que ses 5 sous fractions ont été collectées et analysées par CLHP couplée à la spectrométrie de masse ESI-LC/MS.

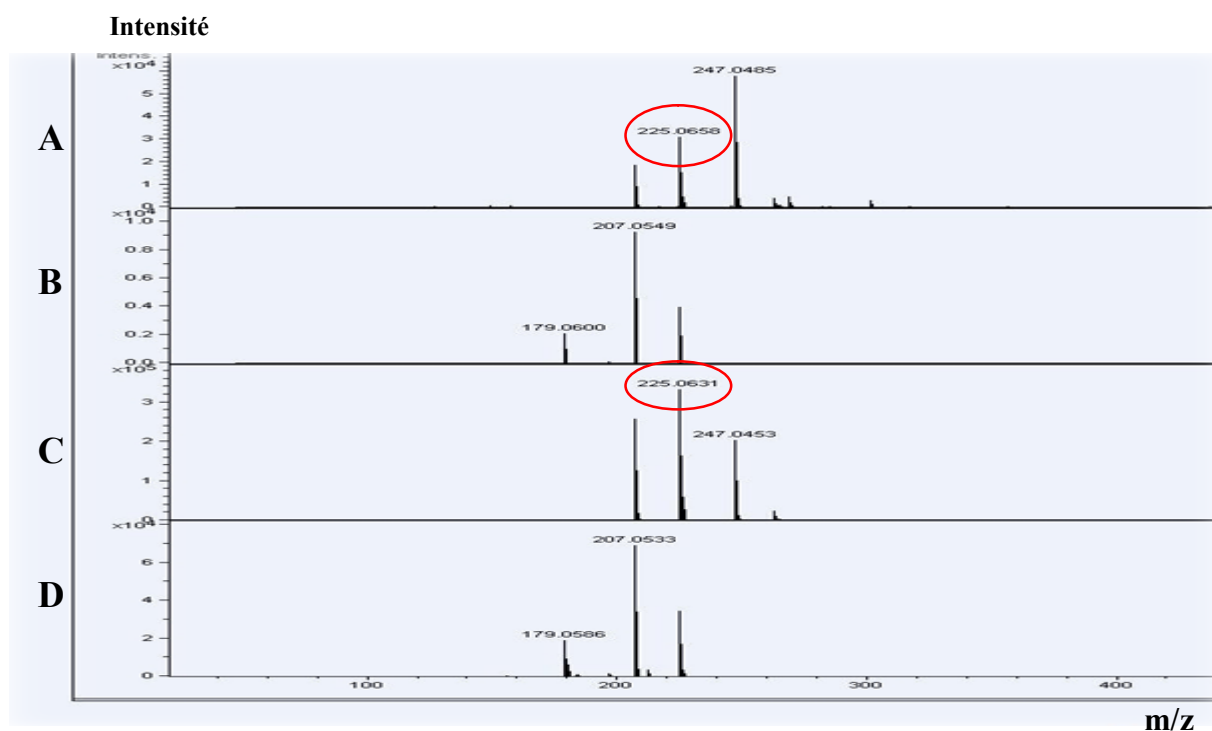
### 2. 3. 3. 1. Analyse à 280 nm

La fraction 3 détectée à 280 nm a été analysée par ESI-LC/MS. La figure 37 montre l'existence de trois espèces moléculaires majoritaires dans cette fraction. Ces molécules ont des  $m/z$  de 207  $[M-H_2O+H]^+$ , 225  $[M+H]^+$  et 247  $[M+Na]^+$ . Ces trois espèces moléculaires peuvent correspondre à une même molécule d'une  $m/z$  de 224. Cette molécule a été fragmentée par spectrométrie de masse en tandem ESI-LC/MS/MS et le résultat (figure 38. B) révèle deux espèces avec des  $m/z$  de 207  $[M-H_2O+H]^+$  et 179  $[M- Na-H_2O- 4 H]^+$ .

Une molécule candidate a attiré notre attention, c'est la phénazine-1-carboxylate. Elle a une masse moléculaire de 224 et, elle est produite par *P. aeruginosa* (figure 25) (Byng *et al.*, 1979 ; Darby *et al.*, 1999 ; Denning *et al.*, 2003 ; Liang *et al.*, 2011). La phénazine-1-carboxylate commerciale (InFarmatik, Hongrie) a été analysée par spectrométrie de masse (figure 38 C). Le même profil a été obtenu par rapport à la molécule d'une  $m/z$  de 224. La phénazine-1-carboxylate a été aussi fragmentée par spectrométrie de masse en tandem ESI-LC/MS/MS. Nous avons obtenu des ions fils de  $m/z$  de 207 et 179 (figure 38 D). Ces mêmes masses ont été détectées pour la molécule d'une  $m/z$  de 224.



**Figure 37 : Masses majoritaires détectées dans la fraction 3.** La fraction 3 éluée entre 10 et 15 min a été analysée par ESI-LC/MS. L'analyse a été effectuée pour des  $m/z$  comprises entre 100 et 1500.



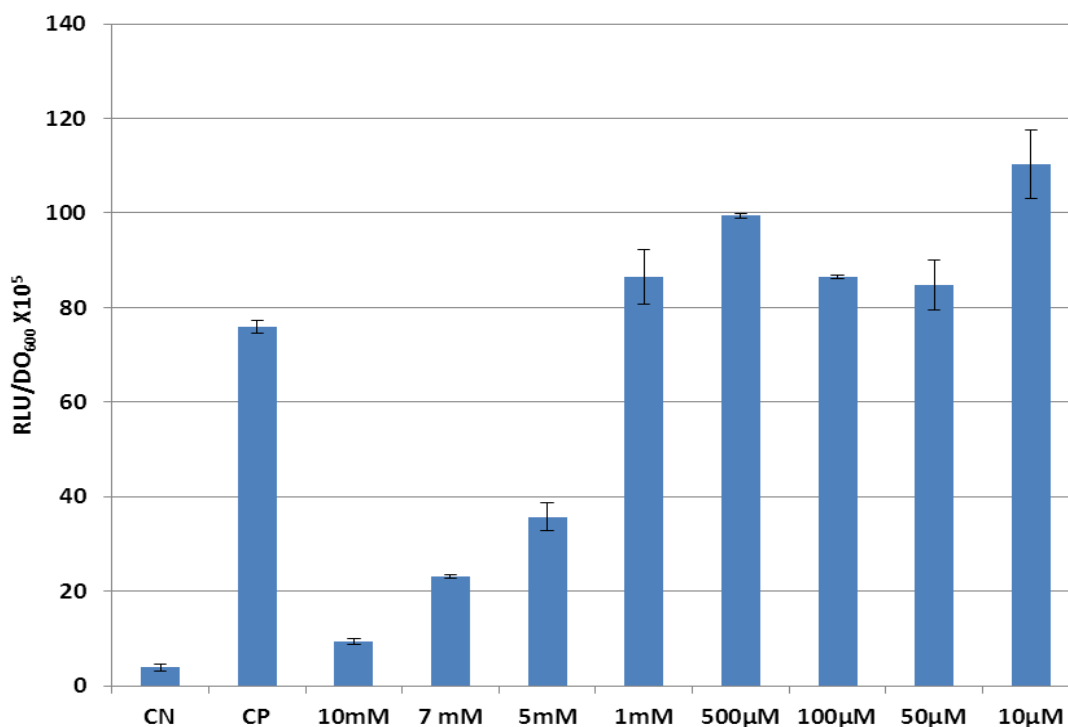
**Figure 38 : Spectre de masse de la phénazine-1-carboxylate.** Spectre des masses majoritaires de la fraction 3 (A) et de la phénazine-1-carboxylate commerciale (C) obtenus par spectrométrie de masse. Fragmentation par spectrométrie de masse en tandem ESI-LC/MS/MS de la molécule de m/z de 225 contenue dans la fraction 3 (B) ou la phénazine-1-carboxylate (D).

Ces résultats nous ont poussés à vérifier si la phénazine-1-carboxylate pourrait avoir directement une activité de répression du SSTT (activité PARST). Pour se faire, cette molécule a été solubilisée dans de l'eau et le pH a été ajusté à 7,2 par le NaOH. La souche rapportrice *CHA(pSlux)* inoculée à une  $DO_{600}$  initiale de 0,05 a été cultivée sous les conditions d'induction du SSTT en présence de concentrations allant de 10  $\mu$ M à 10 mM de la phénazine-1-carboxylate. La figure 39 montre que cette molécule réprime l'expression du gène *exoS* à 10 mM, 7 mM et 5 mM. La répression est plus forte à 10 mM (88%). Pour les autres concentrations la répression est nulle. Ces résultats indiquent que la phénazine-1-carboxylate réprime le SSTT uniquement à haute concentration. La question posée est maintenant quelle est la quantité de cette molécule produite par la bactérie ?

Des surnageants lyophilisés ont été préparés, comme décrit dans la figure 32, à partir de cultures des souches *CHA*, *CHA $\Delta$ trpA*, *CHA $\Delta$ aroA*, *CHA $\Delta$ kynA* et *CHA $\Delta$ kynU*. Le gène *aroA* code pour la 3-phosphoshikimate-1 carboxyvinyltransférase. La mutation de ce gène permet de rendre la souche auxotrophe pour les acides aminés aromatiques. La phénazine-1-carboxylate a été dosée dans les différents surnageants par CLHP en phase inverse. Ces



derniers avant d'être analysé, ont été resuspendus dans le mélange d'éluion (méthanol/eau). Comme pour les surnageants bactériens, le milieu VB a également subi les différents étapes décrites dans la figure 32 afin de l'utiliser comme contrôle négatif.



**Figure 39 : Évaluation de l'activité PARST de la phénazine-1-carboxylate.** La souche CHA*pSlux* contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel pSlux dans son chromosome a été cultivée à 37°C dans le LB en présence des concentrations suivantes de la phénazine-1-carboxylate : 10 µm, 50 µm, 100 µm, 500 µm, 1 mM, 5 mM, 7 mM et 10 mM. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 3 heures de cultures à 37°C et sous une agitation de 250 rpm. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (condition de non induction, 5 mM du CaCl<sub>2</sub>), CP : contrôle positif (condition d'induction, 5 mM EGTA et 20 mM MgCl<sub>2</sub>).

Le tableau 10 montre que la souche CHAΔ*aroA* ne produit pas de phénazine-1-carboxylate. La souche CHAΔ*trpA* qui pour rappel ne réprime pas le SSTT n'en produit presque pas non plus. La quantité produite par les deux mutants CHAΔ*kynA* et CHAΔ*kynU* est très faible (1,1 et 2,8 µg respectivement) par rapport à la quantité produite par la souche sauvage CHA (27,8 µg). Cette dernière produit 1,4 µg/mL ce qui correspond à une molarité de 6,25 µM. Or, à une concentration de 10 µM, la phénazine-1-carboxylate ne réprime pas

l'activité du SSTT. Par conséquent, le signal PARST ne pourra pas correspondre uniquement à la phénazine-1-carboxylate qui réprime le SSTT à des concentrations non physiologiques.

Surnageant	phénazine-1-carboxylate ( $\mu\text{g}/\text{extrait sec de 20 mL}$ )
VB	ND
CHA $\Delta$ <i>trpA</i>	0,04
CHA $\Delta$ <i>aroA</i>	ND
CHA	27,8
CHA $\Delta$ <i>kynA</i>	1,1
CHA $\Delta$ <i>kynU</i>	2,8

**Tableau 10 : Dosage de la phénazine-1-carboxylate.** Les souches CHA, CHA $\Delta$ *trpA*, CHA $\Delta$ *aroA*, CHA $\Delta$ *kynA* et CHA $\Delta$ *kynU* ont été cultivées dans un volume de 20 mL. Des surnageants lyophilisés ont été préparés comme décrit dans la figure 37. La phénazine-1-carboxylate a été dosée dans les différents surnageants par CLHP en phase inverse (colonne de type C18) avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). ND : non détecté.

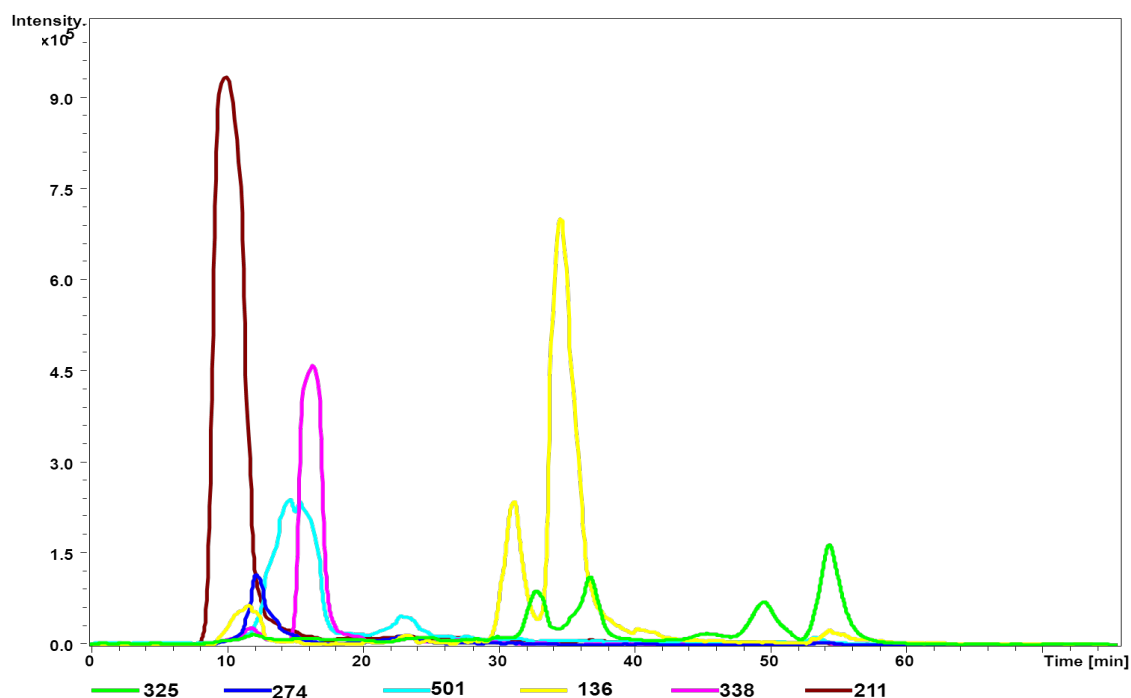
### 2. 2. 3. 1. Analyse à 254 nm

Puisque à 280 nm très peu d'espèces moléculaires ont été détectées, des analyses supplémentaires ont été effectuées à d'autres longueurs d'onde dont 254 nm. La figure 40 montre les différentes espèces moléculaires qui ont été détectées à cette longueur d'onde dont les espèces majoritaires ont des m/z de : 136, 211, 274, 325, 338 et 501. La fraction 3 du milieu VB (le milieu dans lequel le surnageant a été préparé) a été également analysée à 254 nm (cf. annexe 1). Cette dernière contient une espèce majoritaire d'une masse de 325. Elle ne correspond probablement pas au PARST car elle est déjà présente dans le milieu de culture.

Les sous fractions de la fraction 3, issue du surnageant de la souche CHA, ont été également analysées à 254 nm. Les résultats ont été résumés dans le tableau 11 (pour plus de détails, cf. annexe 1). Nous avons pu avoir une séparation relative des différentes espèces moléculaires présentes dans la fraction 3.

Les masses 136, 211, 274, 338 et 501 ne font pas partie des masses éluées dans la sous fraction 1 qui n'a presque pas d'activité PARST. Dans cette sous fraction, nous avons détecté une faible présence des masses suivantes : 227, 263, 315 et 431. Il est possible que dans la sous fraction 1, les sels soient élués.

Pour les deux sous fractions les plus actives 2 et 3, les masses suivantes sont éluées : 136, 274, 338 et 501, mais pas la masse 211. Ces deux sous fractions ont donc la même composition et, elles peuvent correspondre à une même fraction. Bien que les intensités des différentes masses soient supérieures dans la fraction 2 (sauf pour la masse de 274), les deux sous fractions 2 et 3 ont des activités PARST presque proches (68% et 70% respectivement). De ce fait, Deux hypothèses sont possibles : la première consiste en l'existence d'un seuil d'induction de l'activité PARST, au-dessus duquel cette activité reste stable. La deuxième consiste en l'existence d'autres molécules à activité PARST dont la présence fait augmenter l'activité PARST.



**Figure 40 : Les masses majoritaires détectées dans la fraction 3 issue du surnageant de la souche CHA.** La fraction 3 éluée entre 10 et 15 min et issue du surnageant de la souche CHA a été analysée par ESI-LC/MS. L'analyse a été effectuée, pour des m/z comprises entre 100 et 1500, avec une colonne en phase inverse (colonne de type C18) et une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Un détecteur U. V nous a permis de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 254 nm.

La deuxième hypothèse est la plus probable car la masse de 211 est fortement présente dans la sous fraction 5 possédant une activité PARST de 58%. Cette sous fraction ne contient que la masse de 211 avec une faible présence de la masse 274. La sous fraction 4 contient les deux masses 211 et 274. Mais son activité PARST est de 25% (presque la moitié par rapport à

la fraction 5). L'intensité de la masse 211 dans la fraction 5 est presque le double par rapport à la fraction 4. Cependant, elle contient 6 fois moins de la masse 274 par rapport à la fraction 4. Ceci indique que la masse 211 est probablement la seule des espèces détectées, qui est à l'origine de l'activité PARST dans les deux sous fraction 4 et 5. Par conséquent, la masse 274 n'est pas impliquée dans l'activité PARST. Ceci pourra expliquer le fait d'avoir des activités PARST proches pour les deux sous fractions 2 et 3 (68% et 70% respectivement) bien que les intensités des différentes masses soient supérieures dans la fraction 2, sauf pour la masse de 274 (même intensité).

		La sous fraction				
		1	2	3	4	5
Activité PARST		≈0	68%	70%	25%	58%
Masses majoritaires m/z	136	ND	2,6 x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>5</sup>	ND	ND
	211	ND	ND	ND	5,4 x10 <sup>5</sup>	13 x10 <sup>5</sup>
	274	ND	1,6 x10 <sup>5</sup>	1,5 x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup>	0,5 x10 <sup>5</sup>
	338	ND	5,6 x10 <sup>5</sup>	3,5 x10 <sup>5</sup>	ND	ND
	501	ND	6 x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>5</sup>	ND	ND

**Tableau 11 : Les masses majoritaires détectées dans les sous fractions de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** L'activité PARST de chaque sous fraction est indiquée en pourcentage d'inhibition de l'expression des gènes du SSTT. L'intensité de présence de chaque masse est indiquée pour chaque fraction. ND : non détectée.

La masse, le temps de rétention et le profil de fragmentation par ESI-LC/MS/MS peuvent permettre d'identifier les molécules correspondant aux masses détectées ou proposer des molécules candidates. Comme la masse et le temps de rétention sont connus, nous avons essayé d'obtenir le profil de fragmentation de chaque espèce par ESI-LC/MS/MS. En effet, l'appareil utilisé peut donner des formules brutes possibles correspondantes aux m/z enregistrées. L'analyse a été effectuée, pour des m/z comprises entre 100 et 1500. Malheureusement, même avec les profils de fragmentation obtenus pour chacune des espèces étudiées (cf. annexe 2), il n'a pas pu être identifié de candidats possibles.

---

Dans cette tentative d'identification de la/les molécules PARST, un protocole de purification et d'extraction a été validé au cours duquel l'activité PARST est stable. L'ensemble de ces analyses a permis de détecter certaines masses correspondant à des molécules à activité PARST. Par CLHP semi-préparative, des fractions à activité PARST ont été obtenues. La fraction la plus active (la fraction 3) a été fractionnée par CLHP semi-préparative afin de séparer les molécules inhibitrices. Des analyses par ESI-LC/MS et ESI-LC/MS/MS ont également été réalisées. À 280 nm une molécule d'une masse de 224 pouvant correspondre à la phénazine-1-carboxylate a été détectée. Des tests ont montré que la phénazine-1-carboxylate réprime le SSTT de *P. aeruginosa* uniquement à haute concentration. Cependant, la bactérie en produit des faibles quantités. À 254 nm, deux groupes de molécules possédant une activité PARST ont été détectés. Il est possible que ces deux groupes agissent en synergie pour générer une activité PARST bien supérieure à celle induite par l'un des deux isolé. Malheureusement, nous n'avons pas pu identifier ces molécules. L'existence d'autres molécules qui n'ont pas pu être détectées est encore possible.

### 3. Discussion

L'expression du SSTT est contrôlée par des réseaux de régulation très complexes. Cette régulation est mise en action à la suite de nombreux signaux environnementaux probablement, afin d'optimiser l'énergie consommée pour l'expression des protéines du SSTT (Diaz *et al.*, 2011; Hueck, 1998; Yahr and Wolfgang, 2006). Ce système est très important au cours d'une infection aiguë, mais il n'est pas nécessaire pour le maintien d'une infection chronique (Dacheux *et al.*, 2000; Dahan *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2003; Faucher *et al.*, 2006; Hauser *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Lucchini *et al.*, 2005; Roy-Burman *et al.*, 2001).

Dans le laboratoire, des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie d'inactivation du SSTT (Shen *et al.*, 2008). En effet, cette voie produit un signal inhibiteur du SSTT s'appelant PARST pour « *Pseudomonas* Auto Repressor of Secretion Three ». Ce signal autorépresseur est produit en phase stationnaire de croissance et, il dépend de la densité cellulaire. En outre, il ne dépend pas du quorum sensing mais sa production dépend du tryptophane.

Dans ce travail, nous avons essayé, d'identifier le mode d'action du PARST ainsi que les voies impliquées dans cette signalisation aboutissant à l'inactivation du SSTT. Une forte

---

activité transcriptionnelle des deux gènes *exoS* et *exsA* a été observée (figure 22). Cependant, en présence du PARST, les exotoxines n'ont pas été détectées ni dans le surnageant de la culture ni dans le lysat cellulaire. Par conséquent, nous avons conclu que le PARST agit au niveau post-transcriptionnel. Ceci probablement, en déstabilisant les ARNm des protéines notamment les exotoxines du SSTT. Plusieurs modèles de régulation post-transcriptionnelle ont été proposés (Ventre *et al.*, 2006, Goodman *et al.*, 2004, Heurlier *et al.*, 2004). Ces modèles consistent en des voies de transduction du signal faisant intervenir des systèmes à deux composantes et des petits ARN non codants.

Comme le PARST est un répresseur du SSTT, il est possible qu'il stimule la voie de transduction du signal initiée par le système LadS. Cette voie provoque l'activation du système GacS/GacA qui à son tour stimule la formation du petit ARN non codant RsmZ. Ce dernier se lie à la protéine RsmA qui se lie aux petits ARN non codants. RsmY est un autre petit ARN non codant qui peut aussi interagir avec la protéine RsmA (Valverde *et al.*, 2003). Cette liaison de RsmZ/RsmY avec RsmA est à l'origine d'une déstabilisation des ARNm issus de la transcription des gènes du SSTT. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de préparer des souches rapportrices invalidées dans l'un des gènes : *ladS*, *retS*, *gacS*, *gacA*, *rsmZ*, *rsmY* et *rsmA*. Malheureusement, après plusieurs essais, nous n'avons pas pu obtenir les mutants appropriés. La topologie de certaines régions de l'ADN rend l'inactivation de certains gènes par la technologie *Cre-lox* très difficile voire impossible. Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires pour inactiver les gènes *ladS*, *retS*, *gacS*, *gacA*, *rsmZ*, *rsmY*, *rsmA*. L'application du PARST sur des cultures de ces mutants permettra d'identifier la voie de transduction du signal PARST. Donc, notre hypothèse reste à démontrer car nous n'avons pas les moyens pour le faire. Par conséquent nous nous sommes orientés vers la caractérisation du signal PARST.

Pour la caractérisation du signal PARST, nous avons suivi deux approches : i) une approche génétique afin de déterminer les gènes impliqués dans la biosynthèse du PARST, ii) une approche chimique qui consiste à purifier et caractériser ce signal par CLHP/MS.

La production du PARST dépend du L-tryptophane (Shen *et al.*, 2008) mais comme les bactéries produisent divers D-amino acides (Lam *et al.*, 2009), nous avons vérifié une éventuelle implication du D-tryptophane dans la production du PARST. Nous avons remarqué que la production du PARST dépend du L-tryptophane et non du D-tryptophane car la

complémentation du mutant  $\Delta trpA$  par ajout du D-tryptophane ne restaure pas l'activité d'inhibition du SSTT (figure 24) contrairement au L-tryptophane.

L'évaluation de l'activité PARST des différents mutants de gènes impliqués dans le catabolisme du tryptophane :  $\Delta kynA$ ,  $\Delta kynU$ ,  $\Delta pqsA$ ,  $\Delta phnAB$  et  $phzABC1$  a montré que :

- la voie des kynurénines est faiblement impliquée dans la production du PARST
- la voie du PQS n'est pas impliquée dans la production du PARST
- L'opéron *phnAB* n'est pas impliqué dans la production du PARST
- La voie des phénazines est probablement impliquée dans la production du PARST
- L'antranilate est probablement impliqué dans la production du PARST via la biosynthèse du tryptophane
- L'indole-3-glycerol-phosphate est un métabolite important dans la production du PARST

Le tryptophane est le précurseur du signal PARST. Chez *P. aeruginosa* cet acide aminé est synthétisé à partir du chorismate en passant par l'antranilate et l'indole-3-glycerol-phosphate (figure 30). Ce dernier donne le tryptophane grâce à l'action de l'enzyme codée par le gène *trpA* dont l'inactivation est à l'origine d'une perte de l'activité d'autorépression. Bien que l'antranilate soit un métabolite de la voie des kynurénines, la participation de cette voie dans la production du PARST est très faible. Donc, d'autres voies, plus importantes, sont impliquées dans la production du PARST. L'invalidation des trois gènes *phzA1*, *phzB1* et *phzC1* est à l'origine d'une augmentation de l'activité PARST. Les deux métabolites accumulés : le 2,3-dihydro-3-hydroxyantranilate et le 2-amino-4-deoxyisochorismate pourrait donner soit le chorismate qui, à son tour, donnera le tryptophane; soit donner par la deuxième voie des phénazines ou une autre voie inconnue le PARST. L'hypothèse que ces deux molécules sont impliquées dans la production du PARST reste donc à vérifier

Afin de confirmer une implication de la voie des phénazines dans la production du PARST, il est nécessaire d'évaluer l'activité d'autorépression de différents mutants des deux voies de biosynthèse des phénazines. Les mutants suivants semblent être intéressants :  $\Delta phzE1E2$ ,  $\Delta phzD1D2$ ,  $\Delta phzS$  et  $\Delta phzM$  ainsi que celle des métabolites de cette voie. La délétion de l'opéron *phnAB* (figure 25) devait être à l'origine d'une disparition du signal PARST. Mais ce n'était pas le cas. Ceci pourrait être expliqué par l'existence d'autres voies

---

inconnues et importantes de biosynthèse de l'antranilate ou d'un autre intermédiaire notamment l'indole-3-glycerol-phosphate (figure 30).

La voie du PQS n'est pas impliquée dans la production du PARST car le mutant  $\Delta pqsA$  produit plus de PARST par rapport à la souche sauvage. Ceci indique que l'inactivation du gène *pqsA* rend un métabolite plus disponible pour produire plus de PARST. Ce métabolite pourrait correspondre à l'antranilate. Cependant, la complémentation du mutant  $\Delta trpA$  par ajout d'antranilate ne restaure pas non plus l'activité d'inhibition. En effet, dans le mutant  $\Delta trpA$ , le chorismate donne l'antranilate qui donne, à son tour, l'indole-3-glycerol-phosphate. L'absence de la tryptophane synthase, codée par les deux gènes *trpA* et *trpB*, ne permet pas d'obtenir le tryptophane à partir de l'indole-3-glycerol-phosphate. Donc, compléter une culture du mutant  $\Delta trpA$  par l'antranilate ne permet pas de restaurer l'activité d'inhibition du SSTT car le gène *trpA* étant invalidé, la dernière étape de la biosynthèse du tryptophane est inactivée. Donc, il est possible de supposer que l'antranilate est impliqué dans la production du PARST. Évaluer l'activité PARST du double mutant  $\Delta kynA\Delta phnAB$  et autres mutants ne produisant pas d'antranilate pourrait confirmer cette supposition.

Un protocole a été développé (figure 32) afin de purifier et d'identifier le signal PARST par ESI-LC/MS. La stabilité de ce signal a été vérifiée tout au long de ce processus de purification. Par CLHP semi-préparative nous avons fractionné un surnageant actif et 14 fractions ont été récupérées. Les fractions 3, 9 et 12 ont une activité PARST. La fraction 3 est la plus active. Cette fraction a été analysée par ESI-LC/MS.

À 280 nm, nous avons détecté trois espèces moléculaires pouvant être des fils d'une même molécule d'une  $m/z$  de 224. Cette molécule a été fragmentée par spectrométrie de masse en tandem ESI-LC/MS/MS. Une molécule candidate pourrait correspondre à la phénazine-1-carboxylate. Cette dernière a une masse moléculaire de 224 et, elle est produite par *P. aeruginosa* (figure 25) (Byng *et al.*, 1979; Denning *et al.*, 2003; Darby *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2011). Cette molécule est connue pour avoir une activité antifongique (Thomashow *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2010). La phénazine-1-carboxylate commerciale (InFarmatik, Hongrie) a été analysée par spectrométrie de masse (figure 38 C). Le même profil a été obtenu par rapport à la molécule de  $m/z$  de 224 issue de la fraction 3. L'activité PARST de la phénazine-1-carboxylate a été évaluée. Nous avons constaté que cette molécule réprime le SSTT uniquement à haute concentration. Cependant, la



---

bactérie en produit des faibles quantités. Bien que la souche sauvage et les deux mutants  $\Delta kynA$  et  $\Delta kynU$  ont des activités PARST proches, la quantité de la phénazine-1-carboxylate produite par les deux mutants  $\Delta kynA$  et  $\Delta kynU$  est très faible (1,1 et 2,8  $\mu\text{g}$  respectivement) par rapport à la quantité produite par la souche sauvage (27,8  $\mu\text{g}$ ). Il est donc possible que le signal PARST soit composé de plusieurs molécules qui agissent en synergie dont la phénazine-1-carboxylate n'est pas la molécule la plus impliquée.

À 254 nm, 5 sous fractions ont été analysées et deux groupes de molécules possédant une activité PARST ont été détectés. Le premier groupe se compose des masses 136, 338 et 501. Le deuxième contient une masse de 211. Il est possible que ces deux groupes de molécules, agissent en synergie pour générer une activité PARST bien supérieure à celle induite par l'un des deux groupes. Malheureusement, nous n'avons pas pu identifier ces molécules. En outre, l'existence d'autres molécules qui non pas pu être détectées est encore possible.

Afin d'identifier la/les molécules PARST, il est nécessaire d'optimiser chacune des étapes du processus de purification et notamment les extractions liquide-liquide qui doivent être multipliées. Il faudra également optimiser la séparation en mettant en place un gradient d'éluion de manière à ajuster la polarité du solvant et affiner la séparation des pics correspondant aux molécules polaires constituant le signal d'autorépression. Par la suite, il faudra essayer d'obtenir par CLHP semi-préparative une quantité suffisante de molécules pour une analyse ultérieure par spectroscopie RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ).

Il n'est pas surprenant que *P. aeruginosa* possède une multitude de réseaux de régulation car 8% de son génome code pour des gènes de régulation (Greenberg, 2000; Stover *et al.*, 2000). Comme le PARST est un répresseur du SSTT, il est possible qu'il stimule la voie de transduction du signal initiée par le système LadS. De ce fait, le PARST favoriserait la transition vers une infection chronique. Il est possible que le signal PARST soit composé de plusieurs molécules agissant en synergie et dont la caractérisation précise nécessite encore du travail.

---

## **Chapitre 2 : kynurénines et virulence de *Pseudomonas aeruginosa***

Comme le signal autorépresseur de la sécrétion de type trois, le PARST « *Pseudomonas* Auto Repressor of Secretion Three » dépend du tryptophane, nous avons essayé, dans le chapitre précédent, de déterminer la/les voies du catabolisme du tryptophane impliquées dans la production de ce signal. Parmi les voies testées, la voie des kynurénines bien que faiblement impliquée dans la production du PARST pourrait être importante pour la virulence de *P. aeruginosa* de manière non liée au SSTT.

Afin de survivre au cours des infections ou dans un environnement hostile, *P. aeruginosa* utilise différentes sources de carbone et produit un grand nombre de métabolites secondaires (Kersten and Dorrestein, 2009; Lepine *et al.*, 2004, Matthijs *et al.*, 2004; Ramos, 2004; Sullivan *et al.*, 2011). Le PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) est important pour la virulence de cette bactérie (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher and Manoil, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2006). Or, la voie des kynurénines est essentielle pour la production du PQS via l'antranilate, à partir du tryptophane (Farrow and Pesci, 2007). Cette voie est la source principale de l'antranilate chez *P. aeruginosa* (Farrow and Pesci, 2007, Palmer *et al.*, 2005).

Les cellules eucaryotes telles que les macrophages et les cellules dendritiques produisent également des kynurénines à partir du tryptophane (Juhás *et al.*, 2005; Zelante *et al.*, 2009). L'enzyme clé est l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), homologue de la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) de *P. aeruginosa*. Plusieurs études ont montré que les kynurénines produites par l'IDO modulent la réponse immunitaire de l'hôte (Belladonna *et al.*, 2009). En effet, elles exercent entre autre une action cytotoxique sur les lymphocytes T, B et les NK, elles modulent la réponse cytokinique et sont à l'origine d'une immunosuppression physiologique indispensable par exemple lors de la grossesse pour la tolérance du fœtus.

Pendant toute la durée de l'infection, l'agent pathogène et l'hôte sont en perpétuelle communication. Afin de réussir un processus infectieux, l'agent pathogène utilise un vaste arsenal de facteurs de virulence. Ces derniers lui permettent d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et de pouvoir s'installer et persister. Plusieurs espèces de *Pseudomonas* produisent des kynurénines (Chugani and Greenberg, 2010; Crozier and Moran, 2007; Crozier-Reabe *et al.*, 2008; Farrow and Pesci, 2007; Matthijs *et al.*, 2004; Phillips, 2011; Salcher and Lingens, 1980). Cependant, très peu ou pas de travaux ont étudié le rôle des

kynurénines bactériennes dans la virulence de *P. aeruginosa*. C'est pour cela que la voie des kynurénines nous a particulièrement intéressés. Nous nous sommes posés les questions suivantes : les kynurénines produites par la bactérie sont-elles indispensables pour sa virulence? Sont-elles des modulateurs de la réponse immune contre la bactérie?

Une implication des kynurénines dans la virulence de *P. aeruginosa* pourrait être une cible de lutte considérable contre cette bactérie surtout avec le développement de plus en plus de multirésistance aux antibiotiques.

Répondre à cette problématique représente l'objectif principal des travaux réalisés dans ce chapitre. Pour se faire, nous avons :

- Dosé les kynurénines produites par des souches de *P. aeruginosa* (CHA et certains de ses mutants)
- Mesuré l'activité du promoteur du gène *kynA* sous différentes conditions
- Mesuré différents paramètres de l'infection dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë à la suite d'une infection par la souche sauvage CHA et les deux mutants  $CHA\Delta kynA$  et  $CHA \Delta kynU$
- Dosé les anticorps anti-*pseudomonas* produits à la suite d'une infection par la souche sauvage et les deux mutants  $CHA\Delta kynA$  et  $CHA\Delta kynU$

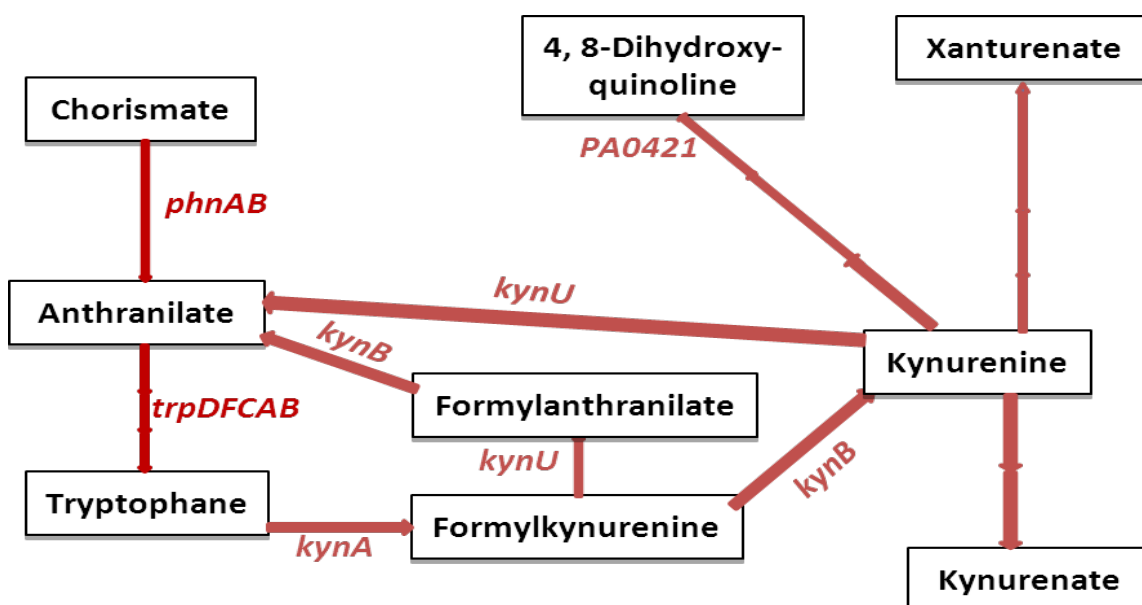


Figure 41 : Voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*. Pour plus de détails, voir la figure 25.

---

Peu de travaux ont étudié la production des kynurénines par *P. aeruginosa*. Farrow et Pesci ont proposé un modèle de la voie des kynurénines dans cette bactérie (Farrow and Pesci, 2007). Dans ce modèle, le tryptophane est dégradé en formyl kynurénine grâce à la tryptophane monooxygénase (TDO) codée par le gène *kynA*. Après, c'est la kynurénine formamidase codée par le gène *kynB* qui dégrade la formyl kynurénine en kynurénine. Par la suite, la kynurénine est dégradée en anthranilate par la kynuréninase codée par le gène *kynU* (figure 41). Il existe plusieurs méthodes de dosage des kynurénines telles que la CLHP et le test colorimétrique d'Ehrlich Kovacs. Dans cette étude, nous avons utilisé le test d'Ehrlich Kovacs.

## 1. Production des kynurénines par *P. aeruginosa*

### 1. 1. Fiabilité du test d'Ehrlich Kovacs

Le réactif d'Ehrlich Kovacs contient le n-Butanol, l'acide chlorhydrique et le Diméthylamino-4-benzaldéhyde. Ce réactif sert à la recherche de l'indole.

Le groupement indole se trouve dans différentes molécules telles que le tryptophane. Pour éviter toute interférence et être sûr de ne doser que les kynurénines, nous avons vérifié la fiabilité de ce test de dosage au réactif d'Ehrlich Kovacs.

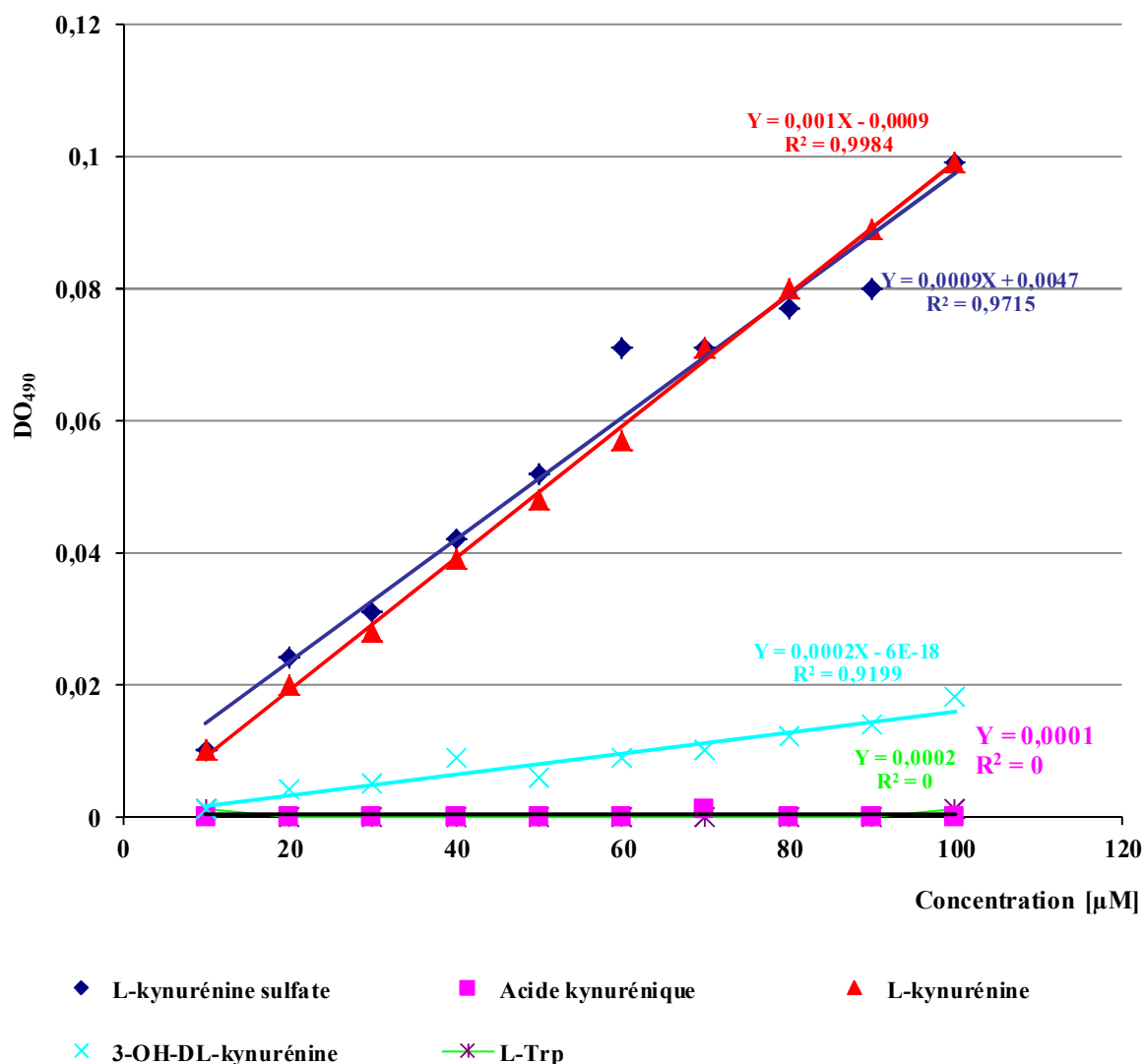
Des solutions de concentrations comprises entre 10 et 100  $\mu\text{M}$  ont été préparées, dans de l'eau déminéralisée, pour la L-kynurénine sulfate, acide kynurénique, L-kynurénine, 3-OH-DL-kynurénine et le L-tryptophane. Dans une plaque de 96 puits, 100  $\mu\text{L}$  du réactif d'Ehrlich Kovacs (Sigma) ont été mélangés avec 100  $\mu\text{L}$  de chaque concentration. Ceci pour toutes les molécules testées. Après 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 490 nm. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé 100  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée.

La figure 42 montre que le réactif d'Ehrlich Kovacs n'interagit ni avec l'acide kynurénique ni avec le L-tryptophane. Il interagit faiblement avec la 3-OH-DL-kynurénine. Cependant il interagit fortement avec la L-kynurénine et la L-kynurénine sulfate. Cette dernière n'est pas produite par la bactérie.

La L-kynurénine a été dosée par le test d'Ehrlich Kovacs et par CLHP dans les surnageants bactériens des trois souches CHA, CHA $\Delta$ *KynA* et CHA $\Delta$ *kynU*. Les résultats sont similaires pour les deux techniques (figure 43).

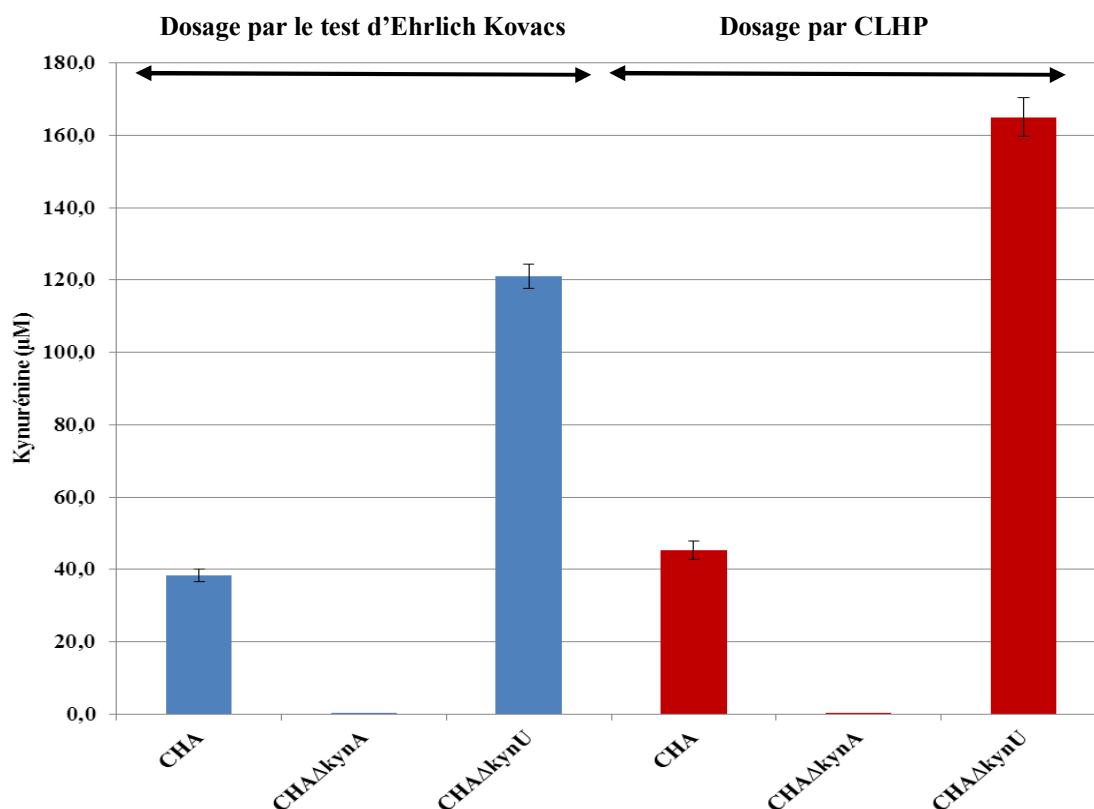
Ces résultats confirment la fiabilité du test utilisant le réactif d'Ehrlich Kovacs pour doser la kynurénine produite par la bactérie. Ce test a été adopté pour la réalisation des

différents dosages ci-après.



**Figure 42 : Le réactif d’Ehrlich Kovacs interagit essentiellement avec la L-kynurénine.**

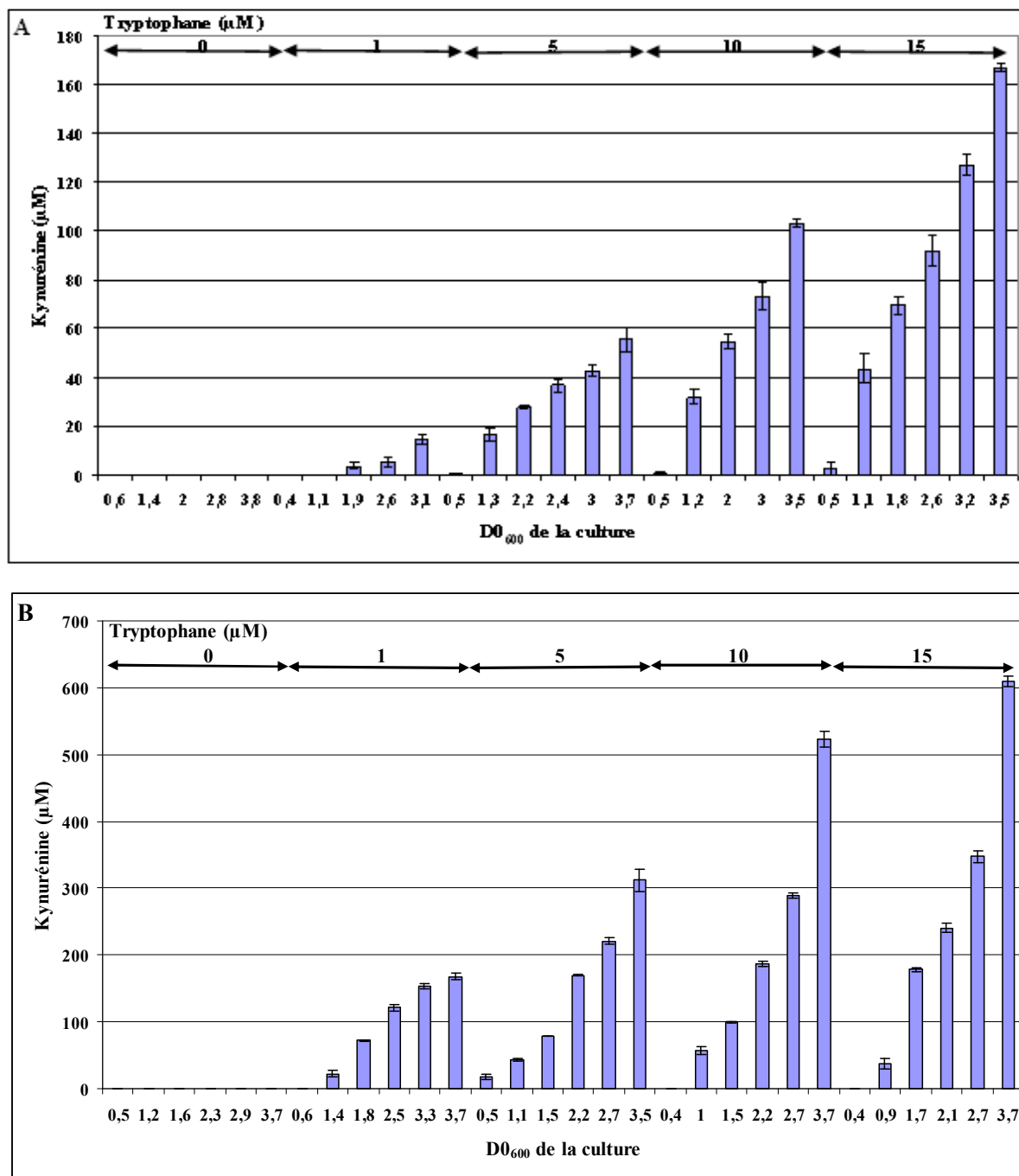
Des solutions de concentrations comprises entre 10 et 100 µM ont été préparées dans de l’eau déminéralisée pour les molécules suivantes : L-kynurénine sulfate, acide kynurénique, L-kynurénine, 3-OH-DL-kynurénine et le L-tryptophane. Dans une plaque de 96 puits, 100 µL du réactif d’Ehrlich ont été mélangés avec 100 µL de chaque concentration. Après 10 minutes, l’absorbance est mesurée à 490 nm. Comme Blanc, nous avons utilisé 100 µL d’eau déminéralisée. Les valeurs de l’absorbance représentent la moyenne (± l’erreur standard) d’au moins trois expériences indépendantes.



**Figure 43 : Dosage de la kynurénine accumulée dans les surnageants des souches CHA, CHAΔKynA et CHAΔkynU.** Les trois souches ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le LB jusqu'à une  $DO_{600} = 3$ . Le dosage a été réalisé par le test d'Ehrlich Kovacs (bleu) : après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20 µm. 100 µL de ce dernier ont été mélangés avec 100 µL du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Un autre dosage a été réalisé par CLHP à 226 nm (rouge) : les surnageants ont été analysés par une colonne C8 (Varian), la phase mobile est constituée du méthanol/eau (7%/93% vol/vol). Les valeurs de la concentration représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

## 1. 2. Le tryptophane est indispensable pour produire des kynurénines

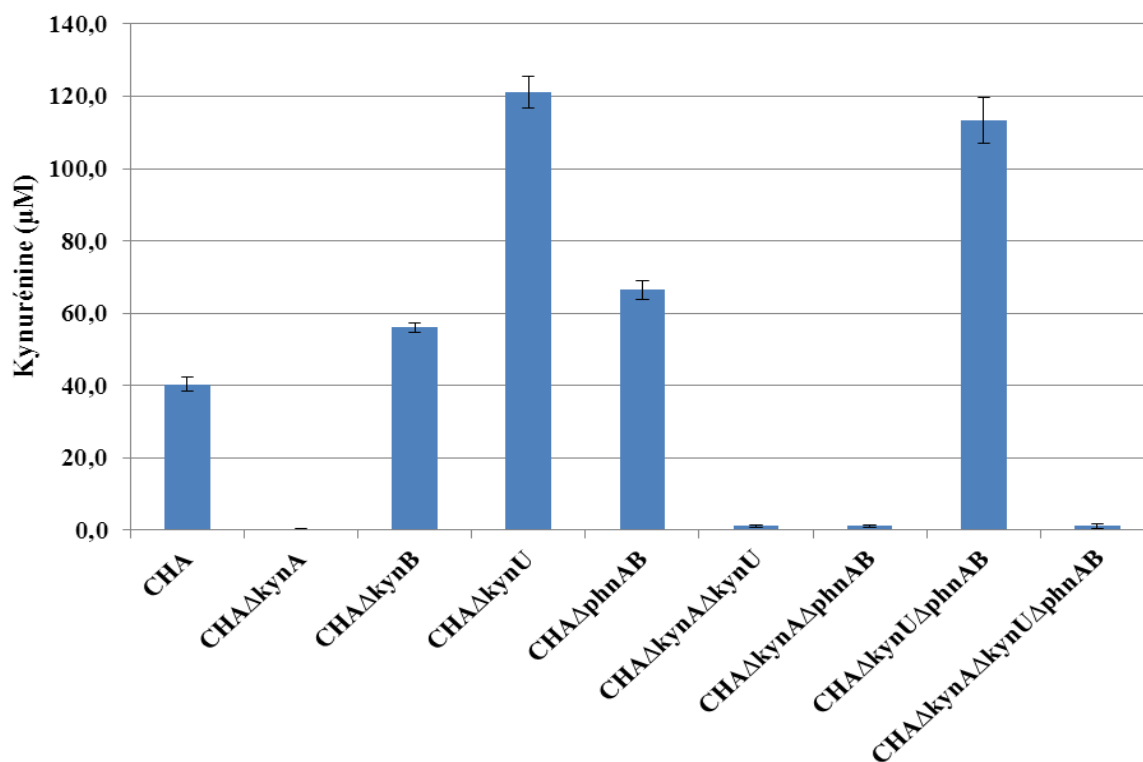
Chez *P. aeruginosa*, le tryptophane est le précurseur des kynurénines (figure 41). Nous avons essayé de confirmer ceci en cultivant les deux souches CHA et CHAΔkynU dans le milieu M9 modifié en présence de concentrations croissantes du tryptophane allant de 0 à 15µM. Le milieu M9 est un milieu chimiquement défini (matériel et méthodes). Grâce au réactif d'Ehrlich Kovacs, la quantité de la kynurénine produite a été dosée à différentes  $DO_{600}$  de la culture ainsi que pour chaque concentration du tryptophane testée.



**Figure 44 : Le tryptophane est indispensable pour la production de kynurénine par *P. aeruginosa*.** Les deux souches CHA (A) et CHA $\Delta$ kynU (B) ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le milieu M9 modifié en présence de concentrations du tryptophane allant de 0 à 15 µM. Des prélèvements ont été effectués à différentes DO<sub>600</sub>. Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20 µm. 100 µL de ce dernier ont été mélangés avec 100 µL du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

La figure 44 montre que la présence du tryptophane dans le milieu est indispensable pour produire de la kynurénine. En effet, en absence du tryptophane les deux souches ne produisent pas de la kynurénine. Mais cette production augmente avec l'augmentation de la concentration du tryptophane dans le milieu. Elle augmente également avec l'augmentation de la DO<sub>600</sub> de la culture. La souche *CHAΔkynU* produit, en général, 4 fois plus de kynurénine par rapport à la souche sauvage. Ces résultats indiquent que la production des kynurénines est dépendante du tryptophane ce qui était prévisible.

En utilisant également le test d'Ehrlich Kovacs, nous avons dosé la kynurénine produite par les souches suivantes : *CHA*, *CHAΔKynA*, *CHAΔkynU*, *CHAΔphnAB*, *CHAΔkynAΔkynU*, *CHAΔkynAΔphnAB*, *CHAΔkynUΔphnAB* et *CHAΔkynAΔkynUΔphnAB*.



**Figure 45 : Dosage de la kynurénine produite par différents mutants de *P. aeruginosa*.**

Les souches *CHA*, *CHAΔKynA*, *CHAΔkynU*, *CHAΔkynB*, *CHAΔphnAB*, *CHAΔkynAΔkynU*, *CHAΔkynAΔphnAB*, *CHAΔkynUΔphnAB* et *CHAΔkynAΔkynUΔphnAB* ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le LB. Des prélèvements ont été effectués à DO<sub>600</sub> = 3. Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20 μm. 100 μL de ce dernier ont été mélangés avec 100 μL du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.



---

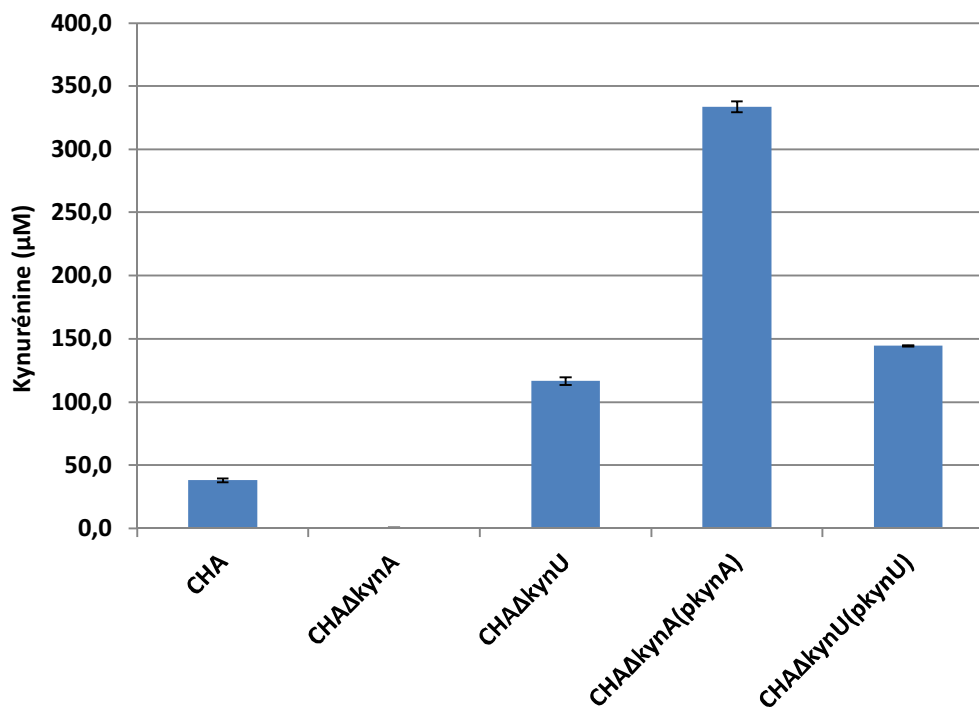
La figure 45 montre que les souches dont le gène *kynA* est délété ( $CHA\Delta KynA$ ,  $CHA\Delta kynA\Delta kynU$ ,  $CHA\Delta kynA\Delta phnAB$  et  $CHA\Delta kynA\Delta kynU\Delta phnAB$ ) ne produisent presque pas de kynurénine. Ceci confirme le fait que la tryptophane 2,3-dioxygénase est l'enzyme clé dans la synthèse des kynurénines. Comme l'opéron *phnAB* est inactivé dans la souche  $CHA\Delta kynU\Delta phnAB$ , cette dernière ne produit normalement pas d'anthranilate (figure 41). Cependant cette souche produit presque autant de kynurénine par rapport à la souche  $CHA\Delta kynU$ . Ceci pourrait être expliqué par le fait que la bactérie utilise le tryptophane disponible dans le milieu de culture pour alimenter la voie des kynurénines. D'autre part, la souche  $CHA\Delta phnAB$  produit 60% et 175% de kynurénine par rapport aux deux souches  $CHA\Delta kynU$  et  $CHA$  respectivement. Ceci est dû au gène *kynU* qui est fonctionnel dans la souche  $CHA\Delta phnAB$ . Ce dernier transforme la kynurénine en anthranilate ce qui réduit la quantité de la kynurénine dosée pour la souche  $CHA\Delta phnAB$ . Comme l'opéron *phnAB* est inactivé dans la souche  $CHA\Delta phnAB$ , elle produit moins d'anthranilate par rapport à la souche sauvage. Pour augmenter sa production, il est possible que l'anthranilate pratique un contrôle positif pour accélérer sa synthèse via la voie des kynurénines. Ceci pourrait expliquer la différence observée entre les deux souches  $CHA$  et  $CHA\Delta phnAB$ . La souche  $CHA\Delta kynB$  produit 150% de kynurénine par rapport à la souche sauvage. En effet, la tryptophane 2,3-dioxygénase, codée par le gène *kynA*, transforme le tryptophane en formylkynurenine. Ce dernier est converti en kynurénine par la kynurenine formamidase (gène *kynB*) ou en formylanthranilate par la kynureninase (gène *kynU*) (figure 41). La délétion du gène *kynB* est à l'origine d'une accumulation de la formylkynurenine dont une partie est convertie en formylanthranilate.

Ces résultats apportent des preuves supplémentaires renforçant l'enchaînement des différentes étapes de biosynthèse et dégradation des kynurénines proposées dans la figure 41.

### 1. 3. Complémentation

Nous avons essayé de compléter les deux souches  $CHA\Delta kynA$  et  $CHA\Delta kynU$  avec le plasmide pUCP20 contenant soit le gène *kynA* ou *kynU*. Les deux gènes ont été amplifiés à partir du génome de la souche  $CHA$ . Après, chaque gène a été cloné dans le plasmide pUCP20 sous le contrôle du promoteur *plac*, inductible à l'IPTG. Chacune des deux souches  $CHA\Delta kynA$  et  $CHA\Delta kynU$  a été électroporée avec le plasmide approprié. Par le test d'Herlich

Kovacs, la kynurénine a été dosée dans les surnageants des souches CHA, CHA $\Delta$ kynA, CHA $\Delta$ kynU, CHA $\Delta$ kynA(pkynA) et CHA $\Delta$ kynU(pkynU).



**Figure 46 : Production de la kynurénine par des mutants de *P. aeruginosa* complémentés.** Les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA, CHA $\Delta$ kynU, CHA $\Delta$ kynA(pkynA) et CHA $\Delta$ kynU(pkynU) ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le LB (contenant 300µg/mL de carbénicilline et d’IPTG à 0,5mM pour les deux souches CHA $\Delta$ kynA(pkynA) et CHA $\Delta$ kynU(pkynU)). Des prélèvements ont été effectués à DO<sub>600</sub> = 3. Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20 µm. 100 µL de ce dernier ont été mélangés avec 100 µL du réactif d’Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l’absorbance a été mesurée à 490 nm. À l’aide d’une gamme kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne ( $\pm$  l’erreur standard) d’au moins trois expériences indépendantes.

La figure 46 montre que la souche CHA $\Delta$ kynA ne produit presque pas de kynurénine. Cependant, la complémentation de cette souche ne restaure pas une production équivalente à celle de la souche sauvage. La souche CHA $\Delta$ kynA(pkynA) produit 8 fois plus de kynurénine par rapport à la souche sauvage. Comme le gène *kynA*, cloné dans le plasmide pUCP20, est sous le contrôle d’un promoteur fort (*plac*), la kynurénine est fortement produite et accumulée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la vitesse de production de la

---

kynurénine est supérieure à sa vitesse de transformation en anthranilate par exemple. En outre, la kynurénine stimule sa propre synthèse comme Farrow et Pesci (Farrow and Pesci, 2007) l'ont montré.

La complémentation de la souche *CHAΔkynU* ne restaure pas le phénotype sauvage. Au contraire, la quantité de kynurénine produite par la souche *CHAΔkynU(pkynU)* est 20% supérieure à celle produite par la souche *CHAΔkynU*. Il est possible qu'une forte présence de la protéine KynU régule négativement son action ce qui est à l'origine d'une accumulation de la kynurénine. Malheureusement, nous n'avons pas d'autres explications possibles.

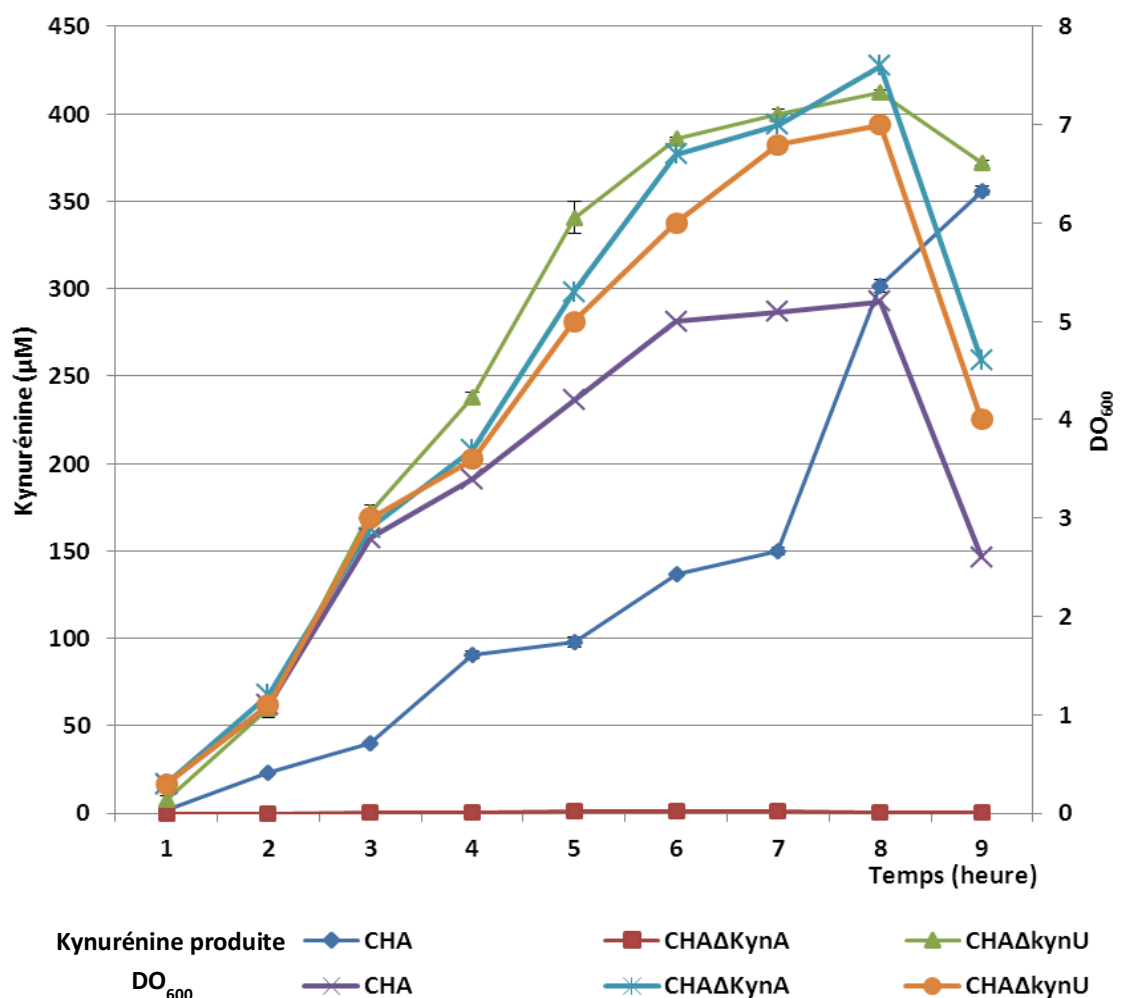
La complémentation par le plasmide pUCP20*kynA* nous a permis d'obtenir une souche surproduisant de la kynurénine, la souche *CHAΔkynA(pkynA)*. Cette souche pourrait être d'une importance considérable pour l'étude du rôle des kynurénines dans la virulence.

#### 1. 4. Cinétique de production de kynurénine par *P. aeruginosa*

En utilisant le réactif d'Ehrlich Kovacs, nous avons essayé de doser la kynurénine produite par la bactérie au cours de la croissance bactérienne. Pour se faire, du milieu LB a été inoculé à  $DO_{600} = 0,1$  à partir d'une culture de 16 heures pour chacune des trois souches *CHA*, *CHAΔkynA* et *CHAΔkynU*. Des prélèvements ont été effectués toutes les heures et la quantité de kynurénine a été évaluée par le test d'Herlich Kovacs.

La figure 47 confirme le fait que *P. aeruginosa* produit de la kynurénine. La souche *CHAΔkynA* n'en produit pas. Ceci indique que le gène *kynA* est indispensable et la voie commençant par ce dernier est probablement la seule pour produire ces molécules chez *P. aeruginosa*. Pour les deux souches *CHA* et *CHAΔkynU*, la production ou l'accumulation de la kynurénine augmente avec la multiplication des bactéries ( $DO_{600}$ ). Pendant les 9 heures de croissance, la quantité de kynurénine accumulée est plus importante pour la souche *CHAΔkynU*. Par exemple, après 6 heures de culture, cette quantité est 3 fois plus importante par rapport à la souche sauvage *CHA*. Ceci pourrait être expliqué comme suit : puisque le gène *kynU* est délété dans le mutant *CHAΔkynU*, la kynurénine produite ne sera pas transformée en anthranilate ou autres métabolites (figure 41). Donc, elle s'accumule dans le milieu de culture et, elle stimule sa propre synthèse renforçant ainsi sa production (Farrow and Pesci, 2007). Cependant, dans la souche sauvage *CHA*, la kynurénine produite est transformée, ce qui fait qu'on dose moins de kynurénine dans le milieu. Ceci indique que la

délétion du gène *kynU* est à l'origine d'une accumulation de kynurénine dans le surnageant bactérien.



**Figure 47 : La tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) est essentielle pour la production des kynurénines chez *P. aeruginosa*.** Les trois souches CHA, CHAΔ*kynA* et CHAΔ*kynU* ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le LB. Des prélèvements ont été effectués toutes les heures (pendant 9 heures de culture). Pour chaque prélèvement, la DO<sub>600</sub> est mesurée. Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20 µm. 100 µL de ce dernier ont été mélangés avec 100 µL du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne (± l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

---

Pour la souche *CHAΔkynU*, la vitesse d'accumulation de la kynurénine est plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance (les 6 premières heures de culture). Après, cette vitesse tend à se stabiliser au cours de la phase stationnaire. Pour la souche sauvage *CHA*, c'est le contraire. En effet, la vitesse d'accumulation est plus importante au cours de la phase stationnaire. Bien que la quantité de la kynurénine accumulée soit toujours plus importante pour la souche *CHAΔkynU*, la vitesse d'accumulation de kynurénine devient plus importante pour la souche sauvage *CHA* après 7 heures de culture. Une explication possible est la suivante : comme la vitesse d'accumulation de kynurénine est plus importante pendant la phase exponentielle pour la souche *CHAΔkynU*, le tryptophane (le précurseur de la kynurénine) est consommé plus rapidement par rapport à la souche sauvage *CHA*. Après, cet acide aminé commence à être épuisé et la vitesse d'accumulation de la kynurénine diminue pour le mutant *CHAΔkynU*. Le déclenchement de mécanismes inconnus de rétrocontrôle au cours de la phase stationnaire est également possible. Ces mécanismes pourraient inhiber la transformation de la kynurénine en anthranilate, ce qui fait que la vitesse d'accumulation de kynurénine augmente pour la souche sauvage au cours de la phase stationnaire (pour le mutant, c'est le tryptophane qui est probablement épuisé).

Ces résultats confirment le fait que *P. aeruginosa* produit de la kynurénine. Le gène *kynA* est indispensable et la voie commençant par ce dernier est probablement la seule pour produire ces molécules chez *P. aeruginosa*. Cette production varie selon la phase de croissance de la bactérie et la délétion du gène *kynU* est à l'origine d'une accumulation de kynurénine dans le surnageant bactérien. D'autre part, nous disposons de trois souches : la souche sauvage *CHA*, une souche ne produisant pas de kynurénine (*CHAΔkynA*) et une souche qui en surproduit (*CHAΔkynU*). Ceci est très important pour l'investigation du rôle des kynurénines dans la virulence de *P. aeruginosa*.

## 2. Activité d'expression du gène *kynA*

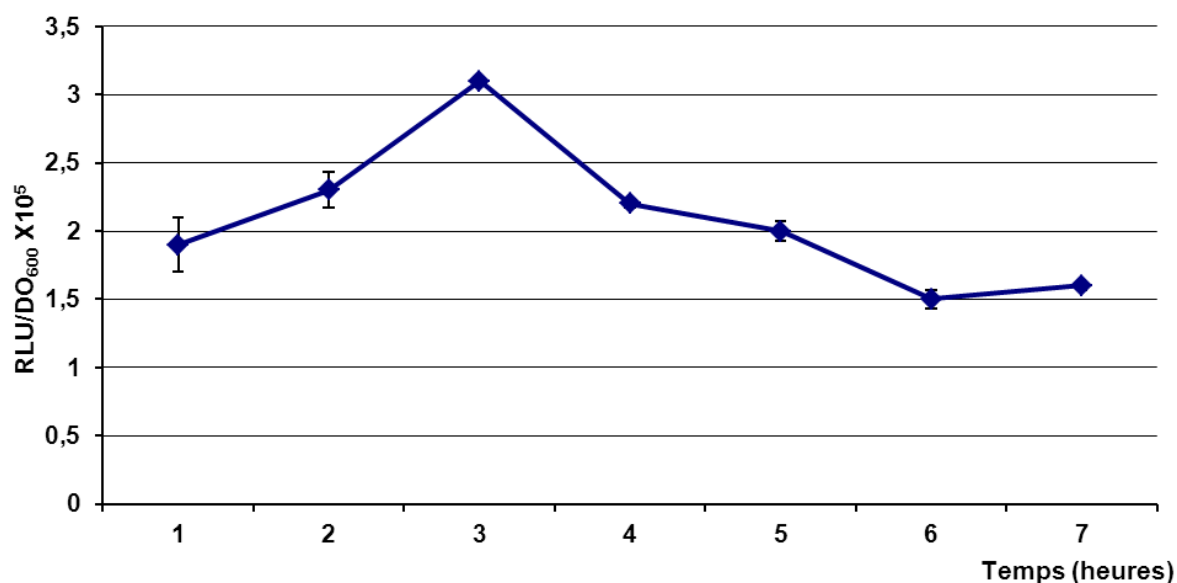
Le gène *kynA* est le gène clé de la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*. Afin d'étudier l'expression de ce gène, 300 pb situées en amont de son codon d'initiation ont été amplifiées. Le fragment résultant a été cloné dans le plasmide mini-CTX-*lux* (partie matériel et méthodes, § 3. 11.) en amont de l'opéron *lux* de la luciférase. Ce fragment contient le promoteur du gène *kynA*. Le plasmide mini-CTX-*pkynAlux* a été utilisé comme décrit dans la partie matériel et méthode pour la préparation de la souche rapportrice *CHA(pkynAlux)*.

## 2. 1. Cinétique d'expression du gène *kynA*

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression du gène *kynA* en fonction du temps. La figure 48 montre que l'expression de ce gène augmente pendant les 3 premières heures et, elle est maximale à 3 heures (phase exponentielle de croissance) puis diminue progressivement. Le fait que la quantité de la kynurénine dosée continue d'augmenter (figure 48) pendant la phase stationnaire nous indique que ce métabolite s'accumule dans le milieu de culture et n'est donc pas utilisé pour d'autres synthèses.

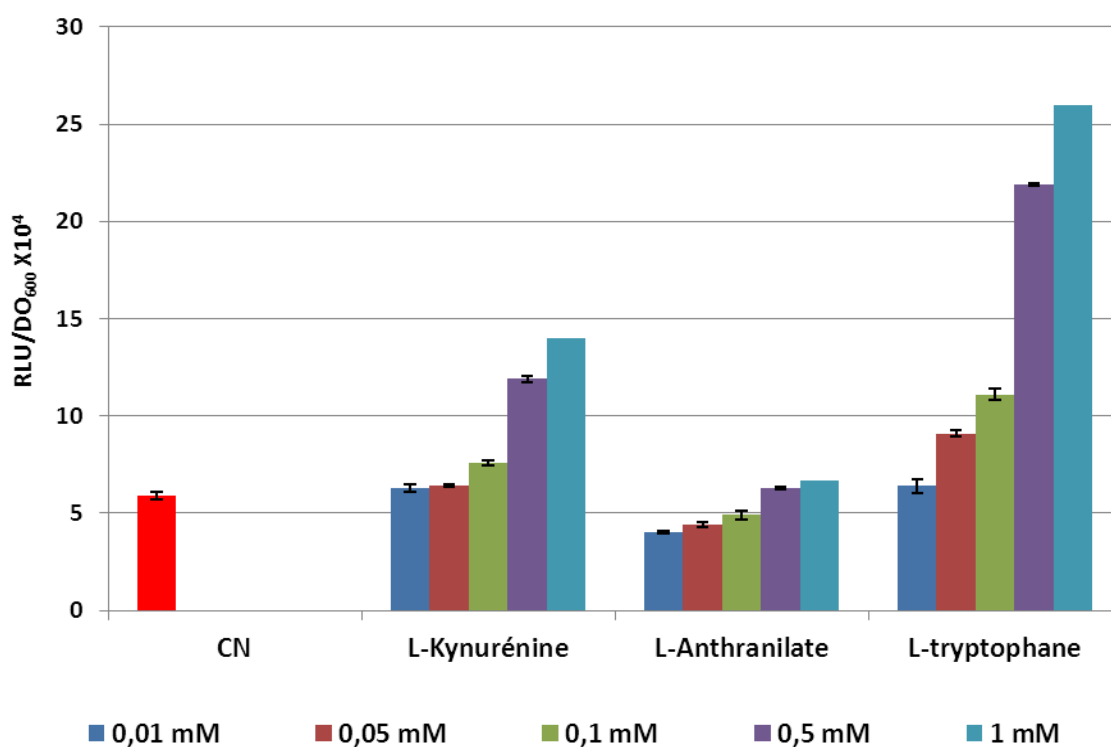
## 2. 2. La kynurénine et le tryptophane induisent l'expression du gène *kynA*

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'effet de différents métabolites sur l'expression du gène *kynA*. Les molécules testées sont la L-kynurénine, le L-anthranilate et le L-tryptophane. Les tests ont été effectués dans le milieu M9 modifié avec ou sans chacun de ces métabolites à différentes concentrations de 0,01 mM à 1 mM.



**Figure 48 : Cinétique d'expression du gène *kynA*.** La souche CHA(*pkynAlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pkynAlux* a été cultivée à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le milieu LB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée toutes les heures jusqu'à 7 heures. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

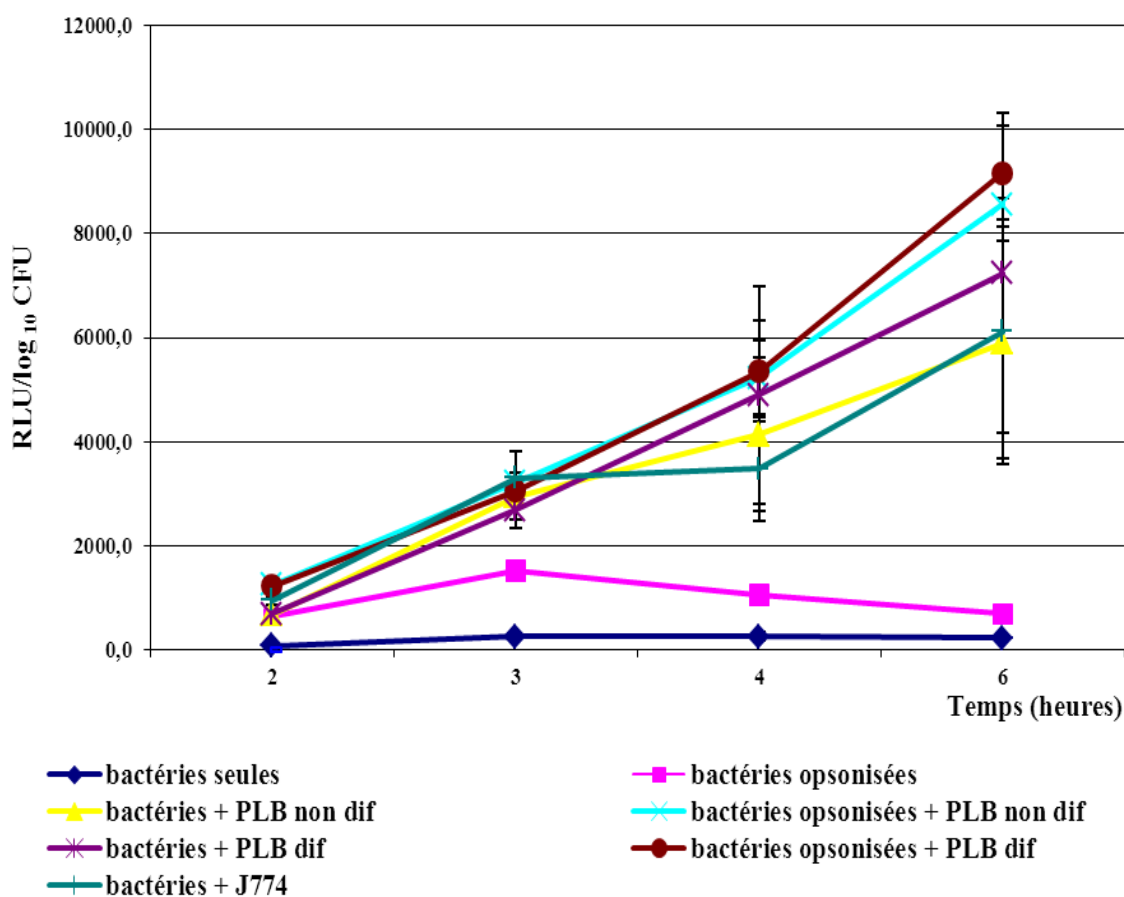
La figure 49 montre que la L-kynurénine et le L-tryptophane sont à l'origine d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène *kynA*. Cette augmentation est proportionnelle à la concentration de la molécule testée. Le L-tryptophane est à l'origine de l'augmentation la plus importante de 5,5 fois pour la concentration de 1 mM, alors que cette augmentation est de 2,5 fois dans le cas de la L-kynurénine. L'ajout de l'antranilate dans le milieu n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle du gène *kynA*. Ces résultats indiquent que le tryptophane et la kynurénine régulent positivement l'expression du gène *kynA* et probablement les autres gènes de la voie des kynurénines.



**Figure 49 : La transcription du gène *kynA* est augmentée en présence de la L-kynurénine et le L-tryptophane.** La souche *CHA(pkynAlux)* a été cultivée à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le milieu M9 modifié +/- la L-kynurénine, L-anthranilate et le L-tryptophane. Ces molécules ont été testées pour des concentrations allant de 0,01 mM à 1mM. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 4 heures de culture ( $DO_{600}$  entre 3 et 3,5). Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la  $DO_{600}$  et les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. CN : contrôle négatif (milieu M9 modifié sans aucun métabolite ajouté).

### 2. 3. Expression du gène *kynA* au cours de l'interaction hôte/pathogène

Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'expression du gène *kynA* au cours de l'interaction hôte/pathogène. Pour ce faire, nous avons mis la bactérie en contact du sérum humain et de deux lignées cellulaires : la lignée de pseudo neutrophiles PLB985 et la lignée de macrophages J774. Les deux lignées cellulaires ont été préparées à une concentration de  $10^7$  cellules/mL.



**Figure 50 : La voie des kynurénines chez *P. aeruginosa* est stimulée au cours de l'interaction hôte/pathogène.** La bactérie *CHA(pkynAlux)* cultivée jusqu'à une  $DO_{600} = 1$  a été, dans le mHBS, mise en contact avec deux lignées cellulaires : les macrophages J774 et la lignée PLB985 (différenciée ou non, opsonisée ou non). La réponse à l'EGTA (5 mM) a également été testée. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée après 2, 3, 4 et 6 heures. Afin de normaliser les valeurs de RLU, des prélèvements ont été réalisés, dilués en cascade et étalés sur PIA. Le lendemain une numération des colonies formant une unité (CFU) est faite pour estimer le nombre de bactérie. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.



---

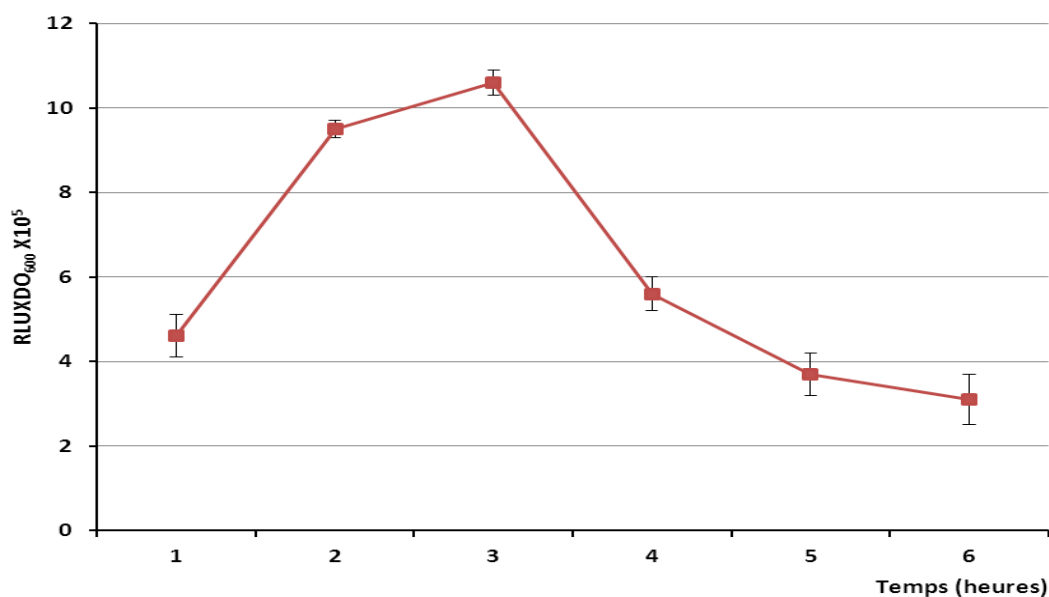
La souche CHA(*pkynAlux*) a été cultivée jusqu'à une  $DO_{600} = 1$  et une suspension bactérienne de  $5.10^8$  bactérie/mL a été préparée. La suspension a été diluée d'un facteur de 10 dans le HBS (condition des bactéries non opsonisées) ou dans le HBS + 10% du sérum AB humain (condition des bactéries opsonisées) avec une incubation de 5 minutes à 37°C sous agitation de 250 rpm. *In vivo*, l'opsonisation est un processus qui consiste à recouvrir les bactéries d'anticorps afin de favoriser leur phagocytose.

L'expérience a été réalisée dans une plaque de 96 puits avec un facteur d'infection (MOI) de 5. La luminescence reflétant l'activité transcriptionnelle du gène *kynA* a été mesurée après 2, 3, 4 et 6 heures du début du test. Afin de normaliser cette luminescence par rapport au nombre de bactéries, des prélèvements ont été réalisés et dilués en cascade et étalés sur le milieu PIA. Le lendemain une numération des colonies formant une unité (CFU) est faite pour estimer le nombre de bactéries.

La figure 50 montre que l'opsonisation des bactéries est à l'origine d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène *kynA*. Le contact des bactéries avec les différentes lignées cellulaires testées est également à l'origine d'une augmentation de cette activité transcriptionnelle. Il semble que cette augmentation soit plus importante lorsque les bactéries sont préalablement opsonisées. L'état de différenciation de la lignée PLB985 n'a pas d'effet significatif. Lorsque les bactéries n'ont pas été opsonisées, la lignée J774 active la transcription du gène *kynA* autant que la lignée PLB985 (la différence est non significative).

Ces résultats indiquent que la voie des kynurénines est induite au contact d'éléments humoraux ou cellulaires de l'hôte. Cette induction résulte de la fixation des anticorps ou de certains composants du complément à la bactérie (opsonisation). Elle peut également avoir lieu à la suite d'un contact entre la bactérie et des cellules de l'immunité telles que les macrophages. Donc, les composants du système immunitaire stimulent la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* ce qui suggère un possible rôle de cette voie au cours de l'infection.

Une cinétique de l'expression du gène *kynU* a été également réalisée en fonction du temps. La figure 51 montre que l'expression du gène *kynU* augmente pendant les 3 premières heures et, elle est maximale à 3 heures (phase exponentielle de croissance). Après, cette activité d'expression diminue progressivement. Ceci pourrait expliquer l'augmentation continue de la quantité de la kynurénine accumulée dans la souche CHA (figure 47), car la dégradation de la kynurénine par le produit de *kynU* diminuerait.



**Figure 51 : Cinétique d'expression du gène *kynU*.** La souche CHA(*pkynUlux*) contenant une simple copie du rapporteur transcriptionnel *pkynUlux* a été cultivée à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le milieu LB. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée toutes les heures jusqu'à 6 heures. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression du gène *kynA* est régulée positivement par le tryptophane et la kynurénine. L'expression de ces gènes est plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance. D'autre part, nous avons montré que certains composants du système immunitaire stimulent la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*. Ces résultats nous poussent encore à nous demander si la voie des kynurénines a un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa*. Pour se faire, une série d'expériences a été réalisée dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*.

### 3. Les kynurénines sont impliquées dans la virulence de *P. aeruginosa*

Le but des travaux entrepris dans cette partie était de mettre en évidence le rôle des kynurénines produites par la bactérie dans la virulence. Nous avons choisi de mener des études *in vivo* en utilisant un modèle d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* chez la souris en collaboration avec l'équipe du Pr Benoît Guery à Lille (équipe 7 NLR in infection and immunity, U1019 Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Faculté de médecine de Lille, pôle recherche). Ces études ont été réalisées selon les protocoles en vigueur dans ce

---

laboratoire (Ader *et al.*, 2007; Ader *et al.*, 2011; Boyer *et al.*, 2005; Chemani *et al.*, 2009; Macé *et al.*, 2008; Pierre *et al.*, 2007; Pierre *et al.*, 2008).

Trois souches de *P. aeruginosa* ont été utilisées : la souche sauvage CHA, la souche CHA $\Delta$ kynA ne produisant pas de kynuénines et la souche CHA $\Delta$ kynU surproduisant des kynurénines. Nous avons étudié la survie des souris et l'évolution de leurs poids à la suite d'une instillation endotrachéale de chacune des souches. La perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire ainsi que la charge bactérienne au niveau des poumons ont été évaluées.

Pour chaque souche, une culture est réalisée en phase liquide dans du milieu LB pendant 16 heures à 37°C et sous agitation de 250 rpm. Deux lavages sont réalisés et le culot bactérien est resuspendu dans du sérum salé isotonique (SSI). Le nombre de bactéries est vérifié par densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) et confirmé par dilution et étalement sur boîtes du milieu Bromo-Cresol Purple agar (BCP). Le dénombrement bactérien est réalisé après une incubation à 37°C pendant 24h.

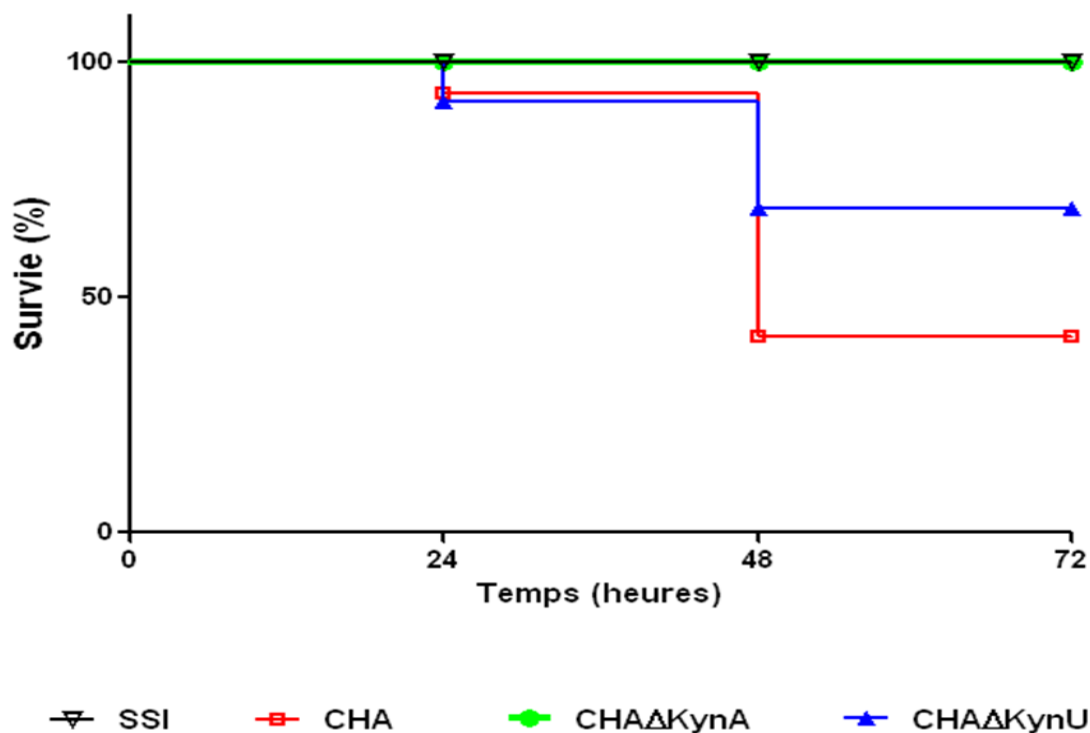
Les animaux utilisés sont des souris femelles C57/Bl6 âgées de 6 semaines et sont pesées avant chaque instillation et avant d'être sacrifiées. Le pourcentage de variation pondérale est calculé à chaque fois. Les souris sont infectées par instillation endotrachéale directe sous anesthésie de courte durée par du Sevoflurane (Sevorane<sup>TM</sup>, Abbott, Queensborough, UK). Les souris contrôle sont instillées dans les mêmes conditions avec 50 $\mu$ l du SSI. Les courbes de survies ont été comparées par un test de log-rank. Pour les histogrammes, les analyses ont été réalisées avec le test de Student. Le logiciel GraphPad Prism 5 a été utilisé. Une différence est considérée comme significative quand  $p < 0,05$ .

### 3. 1. Survie des souris après l'infection

Trois groupes de 5 souris ont été instillés avec une des souches : CHA, CHA $\Delta$ kynA ou CHA $\Delta$ kynU. Pour chaque souris, un volume de 50 $\mu$ l, calibré pour contenir 10<sup>7</sup> bactéries (2.10<sup>8</sup> bactérie/mL du SSI) est injecté. Les souris contrôle sont instillées avec 50 $\mu$ l du SSI dans les mêmes conditions.

La figure 52 montre que l'instillation de la souche CHA $\Delta$ kynA comme celle du sérum salé isotonique (SSI) n'est associée à aucune mortalité. Après trois jours, le taux de mortalité est de 0%. Les souris instillées par la souche CHA $\Delta$ kynU commencent à mourir 24 heures après l'instillation, le taux de mortalité atteint 30% après trois jours. Dans le groupe instillé par la souche sauvage CHA, les souris commencent à mourir 24 heures après l'instillation, le taux de mortalité atteint 60% après trois jours. La survie des souris instillées par la souche

CHA $\Delta$ kynA est meilleure par rapport aux souris instillées par les deux souches instillées par la souche CHA et CHA $\Delta$ kynU ( $p = 0,046$  et  $0,048$  respectivement). La différence de survie observée entre les deux groupes instillés par la souche CHA ou CHA $\Delta$ kynU n'est pas significative ( $p = 0,34$ ). De plus, les souris injectées par ces deux souches ont des poumons très inflammatoires à l'autopsie.



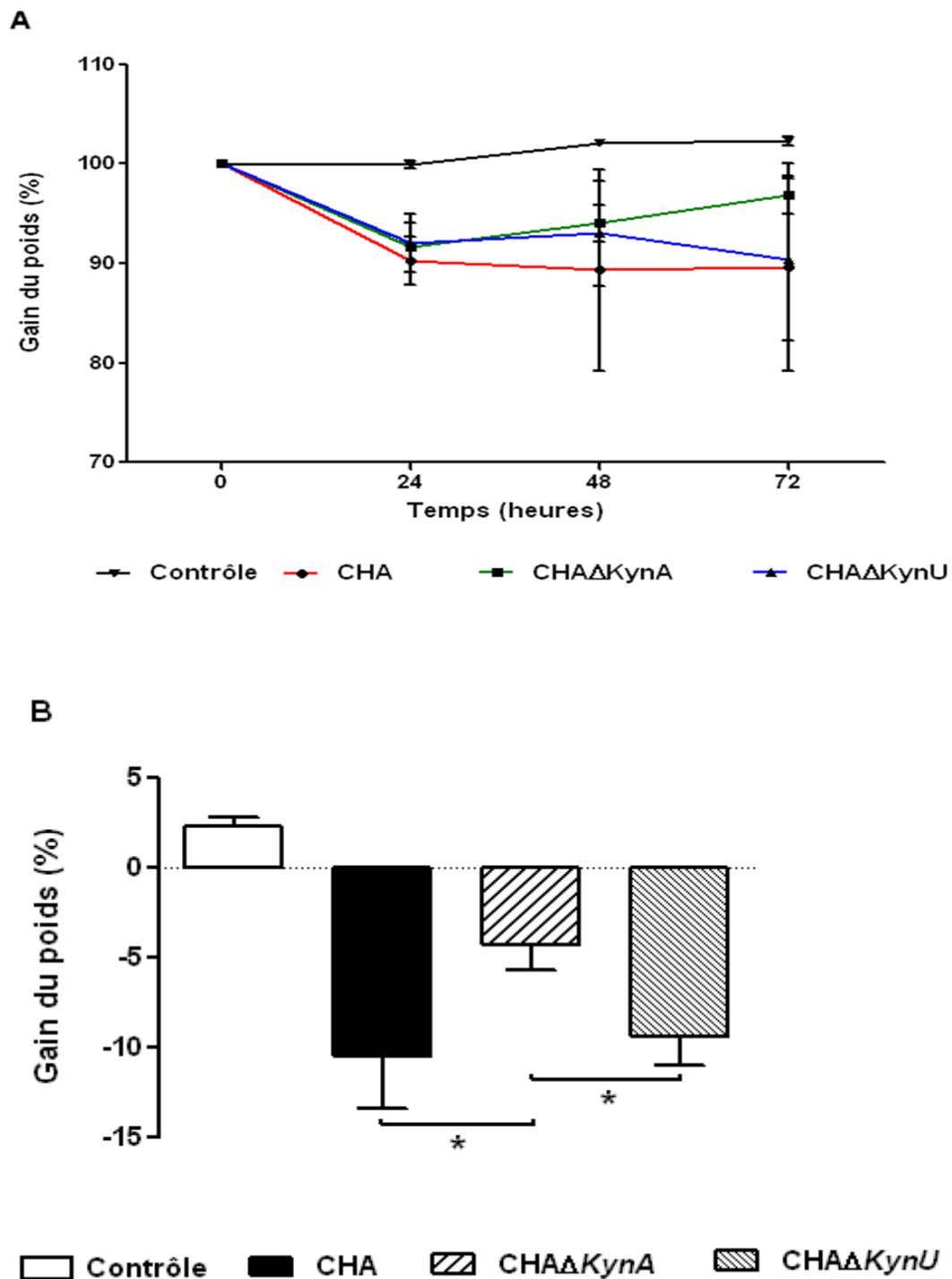
**Figure 52 : Survie des souris instillées avec la souche CHA, CHA $\Delta$ kynA ou CHA $\Delta$ kynU.**

Pour chaque souche, 5 souris ont été instillées chacune avec un volume de 50 $\mu$ l. Ce volume a été calibré pour contenir  $10^7$  bactéries ( $2.10^8$  bactérie/mL). Les souris contrôle sont instillées dans les mêmes conditions avec 50 $\mu$ l du SSI.

La survie des souris dépend de la sévérité de l'infection et donc du pouvoir pathogène de la bactérie. Ces résultats montrent que les deux souches CHA et CHA $\Delta$ kynU sont plus virulentes que la souche CHA $\Delta$ kynA.

### 3. 2. Évolution du poids des souris après l'infection

Trois groupes de 5 souris chacun, ont été instillés par voie intratrachéale avec l'une des souches CHA, CHA $\Delta$ kynA ou CHA $\Delta$ kynU. Après l'instillation, les souris sont pesées au début et à la fin de chaque jour.



**Figure 53 : Poids des souris instillées par la souche CHA, CHAΔkynA ou CHAΔkynU.** A) Évolution, pendant 3 jours, du poids de 3 groupes de souris (n = 5) instillées par l'une des souches CHA, CHAΔkynA ou CHAΔkynU. Les souris sont pesées au début et à la fin de chaque jour. B) La Perte du poids dans chaque groupe de souris correspondant à la différence entre les poids mesurés avant le premier jour et après le troisième jour post infection. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) des poids mesurés pour les 5 souris de chaque groupe. \*p < 0,05.

---

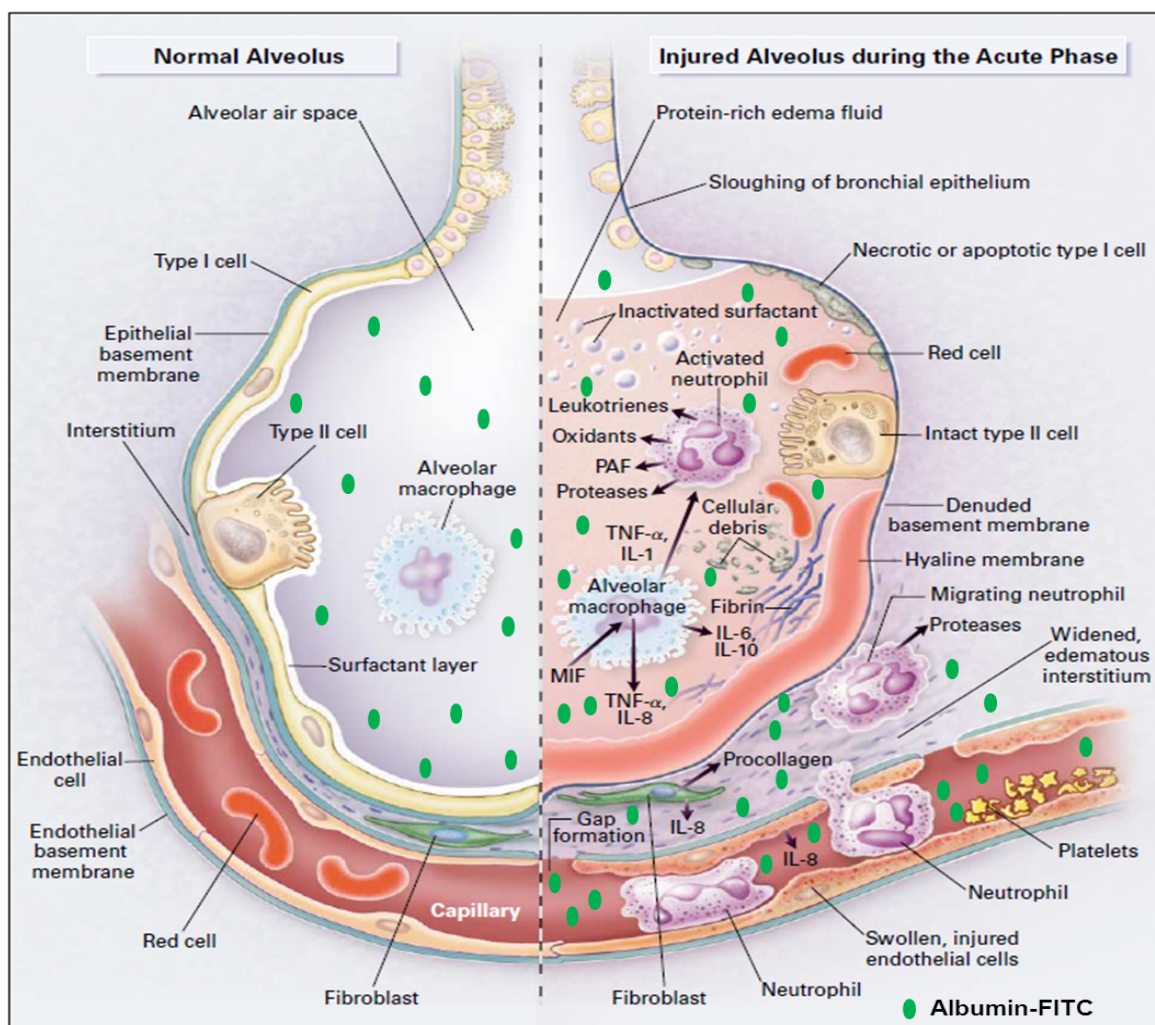
La figure 53. A représente l'évolution du gain du poids des souris après l'infection en fonction du temps. Le poids des souris instillées avec SSI ne varie presque pas pendant les trois jours. Quelle que soit la souche injectée, les souris perdent du poids au premier jour de l'infection :

- Les souris instillées par la souche *CHAΔkynA* perdent 8 % du poids initial pendant le premier jour (figure 53. B). À partir du deuxième jour, elles en regagnent. À la fin du troisième jour, la perte du poids est faible, elle est de 4% (figure 53. B).
- En revanche, les souris instillées par la souche *CHAΔkynU* perdent 8% de leur poids initial pendant le premier jour (figure 53. B). Elles en regagnent pendant le deuxième jour, mais en perdent de nouveau au début du troisième jour. À la fin de ce dernier, la perte est de 9% (figure 53. B).
- Les souris instillées par la souche sauvage *CHA* perdent 9% de leur poids initial pendant le premier jour (figure 53. B). Par la suite, cette perte tend à se stabiliser. Elle est de 10% à la fin du troisième jour post infection (figure 53. B).

Les résultats obtenus indiquent que la perte de poids est plus importante dans le cas des souris infectées par les deux souches *CHA* et *CHAΔkynU*. Les différences observées entre la souche *CHAΔkynA* et les deux souches *CHA* et *CHAΔkynU* sont significatives ( $p = 0,043$  et  $0,03$  respectivement). La différence, très faible, observée entre les deux souches *CHA* et *CHAΔkynU* n'est pas significative ( $p = 0,73$ ). Ceci indique que les différences observées sont liées à une disparition de la production des kynurénines. Au cours d'une infection, la perte de poids résulte entre autre d'une perte d'eau par l'organisme. L'intensité de cette perte est liée à la sévérité de l'infection. Par conséquent, les résultats obtenus montrent bien que l'infection est plus sévère dans le cas des deux souches *CHA* et *CHAΔkynU*. Ceci indique que les kynurénines sont importantes pour la virulence de la bactérie.

### 3. 3. Perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire

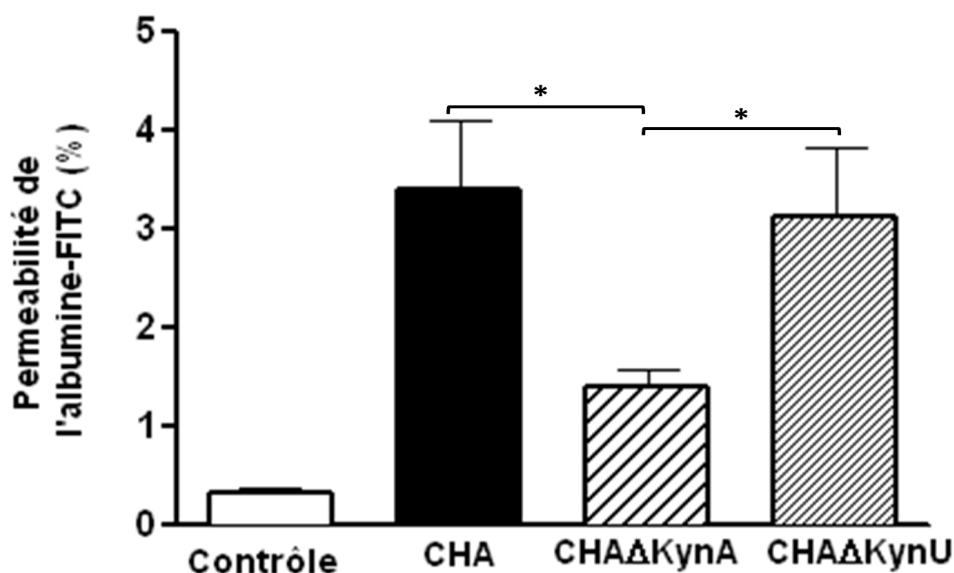
En cas d'infection pulmonaire comme chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* participe à la dégradation progressive des fonctions respiratoires en produisant de nombreux facteurs de virulence.



**Figure 54 : Une alvéole intacte dans l'état normal (à gauche) et une alvéole malade dans le cas d'une pneumonie aiguë (à droite).** Au cours de la phase aiguë d'infection (côté droit), la membrane formée par les cellules épithéliales bronchiques ou alvéolaires perd son intégrité. Les neutrophiles traversent l'endothélium capillaire endommagé et l'interstitium pour aller dans l'alvéole rempli de liquide riche en protéines (œdème). Dans l'aire alvéolaire, les macrophages sécrètent des cytokines, des interleukines et le facteur de nécrose tumorale ( $TNF-\alpha$ ). Les neutrophiles peuvent libérer des oxydants, des protéases, des leucotriènes et d'autres molécules pro-inflammatoires tels que le facteur d'activation plaquettaire (FAP). Un certain nombre de médiateurs anti-inflammatoires sont également présents dans le milieu alvéolaire. L'afflux du liquide œdémateux -dans l'alvéole- riche en protéines conduit à l'inactivation du surfactant. L'albumine marquée à la Fluoresceine Iso-ThioCyanate (FITC) traverse la barrière alvéolo-capillaire détériorée pour finir dans le sang (Ware and Matthay, 2000).

Trois groupes, de 5 souris chacun, ont été instillés par la souche sauvage CHA, la souche  $CHA\Delta kynA$  ou la souche  $CHA\Delta kynU$ . Un groupe de 5 souris a été instillé par du SSI (contrôle). La perméabilité est évaluée par la mesure du passage alvéolo-interstitiel

d'albumine marquée à la Fluoresceine Iso-ThioCyanate (FITC) injecté en intra péritonéal. La fluorescence pulmonaire mesurée est proportionnelle à la concentration de l'albumine-FITC dans le sang et au degré de lésion de la barrière alvéolo-capillaire. Un ratio est établi, permettant de calculer la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire.



**Figure 55 : Perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire après instillation intratrachéale de trois souches de *P. aeruginosa*.** Pour chacune des souches CHA, CHAΔkynA et CHAΔkynU, un groupe de 5 souris a été instillé par un volume de 50μl, calibré pour contenir  $10^7$  bactéries ( $2 \cdot 10^8$  bactérie/mL). Les souris ont été sacrifiées 48 heures après l'instillation. 2 heures avant le sacrifice, l'albumine-FITC a été injecté en intra péritonéal. Sa fluorescence est mesurée dans le sang et dans les poumons. Un ratio est établi, permettant de calculer la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. Les souris « contrôle » ont été instillées par du SSI. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) calculée pour 5 souris par groupe. \*p < 0,05.

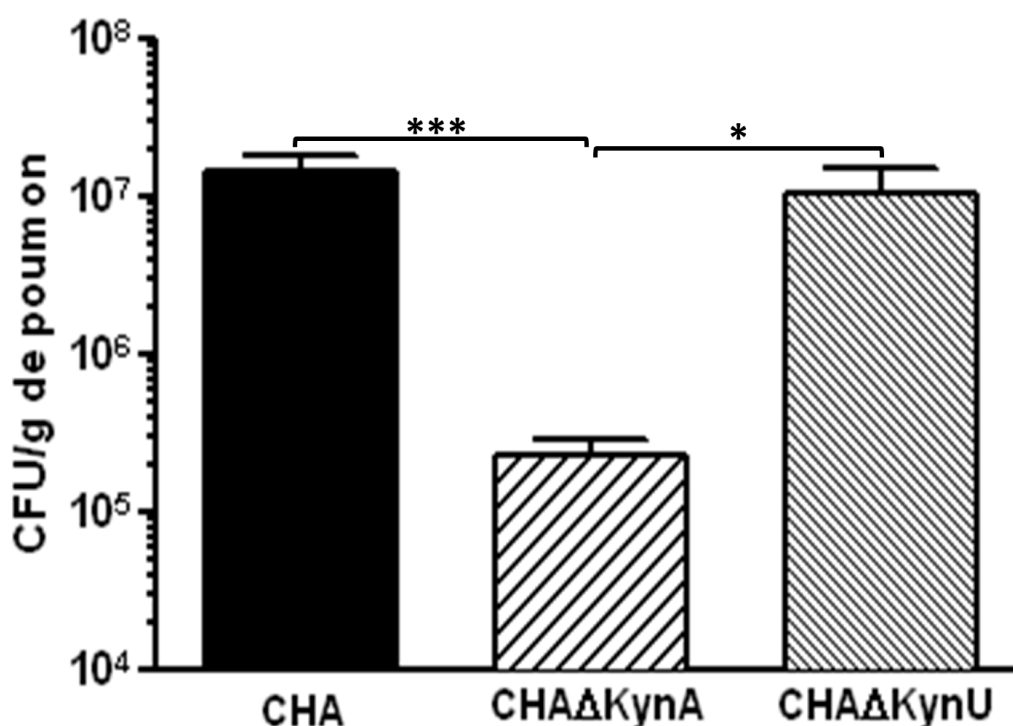
La figure 55 montre que le ratio d'albumine marqué est équivalent dans les deux groupes de souris instillées par la souche sauvage CHA ou la souche CHAΔkynU (la différence n'est pas significative,  $p = 0,79$ ). Le ratio calculé pour les souris instillées par la souche CHAΔkynA est très inférieur par rapport au ratio calculé dans les cas des deux souches CHA et CHAΔkynU ( $p = 0,014$  et  $0,034$  respectivement). Ceci indique que la barrière alvéolo-capillaire dans le groupe de souris instillées par la souche CHAΔkynA est moins perméable à l'albumine-FITC car elle est moins détériorée par rapport aux deux autres groupes. Le degré



de détérioration de la barrière alvéolo-capillaire est lié à la force de l'infection qui dépend, elle-même, de la virulence du pathogène.

### 3. 4. Quantification de la charge bactérienne pulmonaire

La quantité des bactéries dans les poumons au cours de l'infection reflète également la virulence de la bactérie. Nous avons donc mesuré la charge bactérienne pulmonaire après l'instillation des souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU.



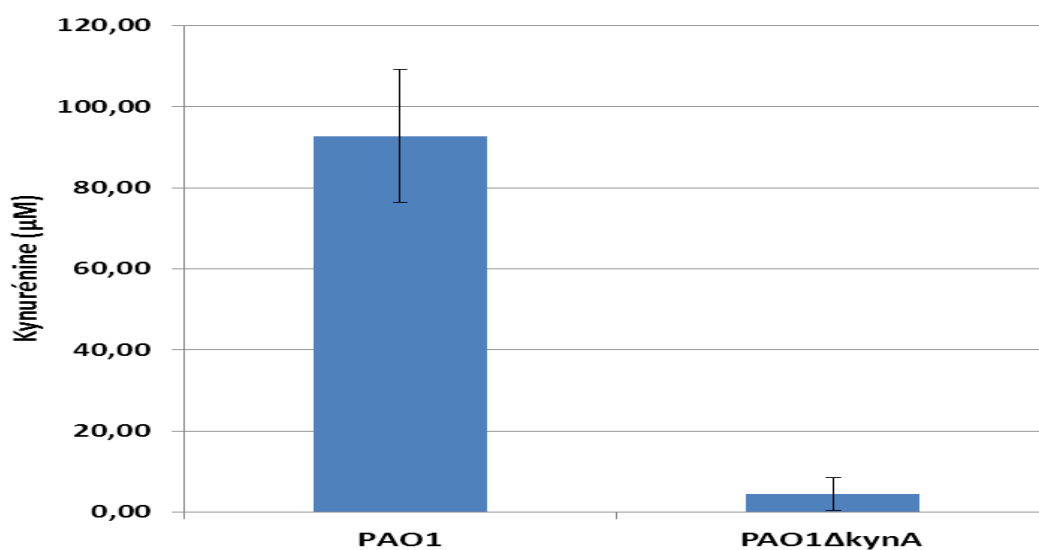
**Figure 56 : Charge bactérienne dans les poumons.** Pour chacune des souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU, un groupe de 5 souris a été instillé par un volume de 50 $\mu$ l, calibré pour contenir  $10^7$  bactéries ( $2 \cdot 10^8$  bactérie/mL). Les souris ont été sacrifiées 48 heures après l'instillation. Les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1mL du SSI stérile. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur gélose BCP. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) calculée pour 5 souris par groupe. \*p < 0,05.

La figure 56 montre que la charge bactérienne est la même dans les poumons instillés par la souche CHA ou CHA $\Delta$ kynU (p = 0,54). Le nombre de bactéries a baissé d'un log par rapport à l'inoculum de départ ( $2 \cdot 10^8$  bactérie/mL). La charge bactérienne dans les poumons

des souris instillées par la souche *CHAΔkynA* est inférieure de 2 log par rapport aux deux autres groupes instillés avec la souche *CHA* ou *CHAΔkynU* ( $p = 0,0007$  et  $0,0362$  respectivement). Le même nombre de bactéries a baissé de 3 log par rapport à l'inoculum de départ ( $2 \cdot 10^8$  bactérie/mL). D'après ces résultats, la clairance de la souche *CHAΔkynA* est beaucoup plus importante. Ces deux dernières sont donc plus résistantes aux mécanismes de défense de l'hôte. Par conséquent, elles persistent plus longtemps dans les poumons. Elles sont donc plus virulentes. Ceci indique que la voie des kynurénines est importante pour la virulence et la persistance de la bactérie dans l'hôte.

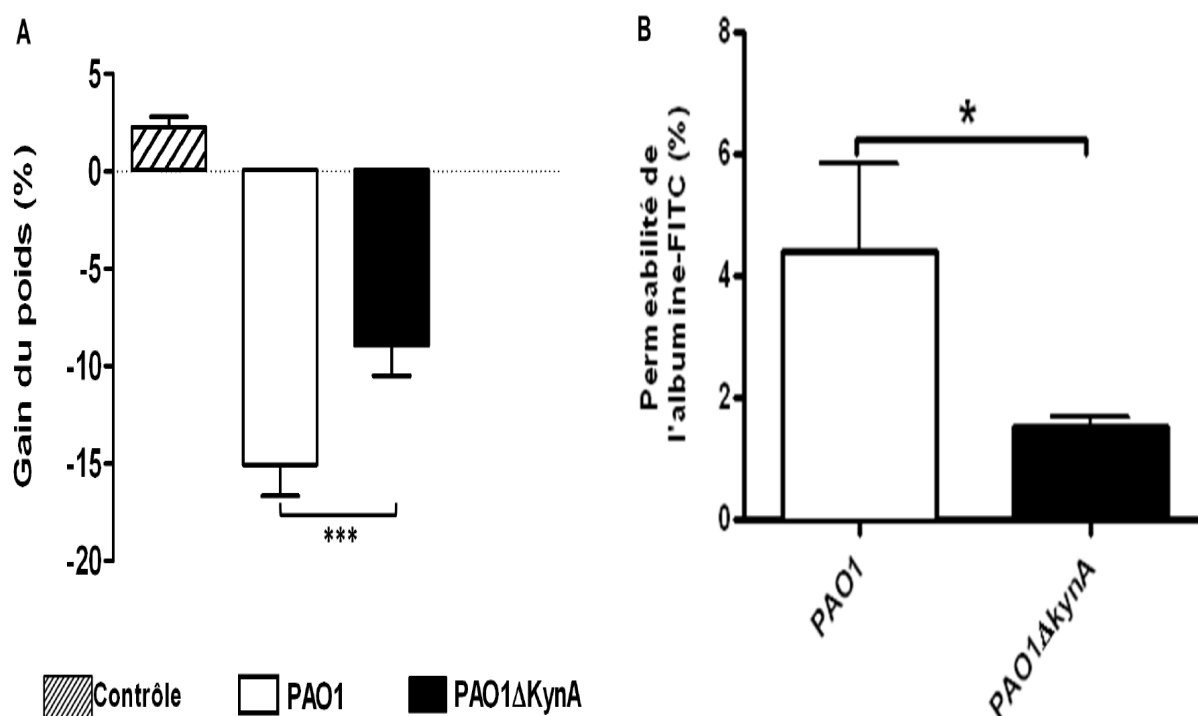
### 3. 5. Les kynurénines et la virulence de la souche PAO1

La souche PAO1 correspond à la souche de *P. aeruginosa* la plus étudiée. Nous avons dosé la kynurénine produite par les deux souches PAO1 et *PAO1ΔkynA*. La figure 57 montre que la souche sauvage PAO1 produit des kynurénines contrairement à la souche *PAO1ΔkynA* qui n'en produit presque pas. D'autre part, la comparaison des deux souches *CHA* (figure 45) et PAO1 (figure 57) montre que cette dernière produit plus de kynurénines.



**Figure 57 : Production de la kynurénine par la souche PAO1 et le mutant *PAO1ΔkynA*.**

Les deux souches PAO1 et *PAO1ΔkynA* ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le LB. Des prélèvements ont été effectués à  $DO_{600} = 3$ . Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à  $0,20 \mu\text{m}$ . 100  $\mu\text{L}$  de ce dernier ont été mélangés avec 100  $\mu\text{L}$  du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.



**Figure 58 : Effet des kynurénines sur la virulence de la souche PAO1.** Pour chacune des souches PAO1 et PAO1Δ*kynA*, un groupe de 6 souris a été instillé par un volume de 50μl, calibré pour contenir 10<sup>7</sup> bactéries (2.10<sup>8</sup> bactérie/mL).

A) La Perte de poids dans chaque groupe de souris correspondant à la différence entre les poids mesurés avant le premier jour et après le troisième jour post infection. B) Évaluation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire après instillation intratrachéale. Les souris ont été sacrifiées 40 heures après l'instillation. La fluorescence de l'albumine-FITC est mesurée dans le sang et dans les poumons. Un ratio est établi, permettant de calculer la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. Les souris « contrôle » ont été instillées

par du SSI. C) Évaluation de la charge bactérienne pulmonaire. Les souris ont été sacrifiées 48 heures après l'instillation. Les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1mL du SSI stérile. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur gélose BCP. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) calculée pour 6 souris par groupe. \*p < 0,05.

---

Comme la souche PAO1 produit des kynurénines, nous avons voulu vérifier si la voie des kynurénines est impliquée dans sa virulence (comme nous l'avons fait pour la souche CHA). Pour se faire, les mêmes tests ont été réalisés pour les deux souches PAO1 et PAO1 $\Delta$ kynA. Les résultats sont présentés dans la figure 58.

La figure 58. A montre que les souris instillées par la souche sauvage PAO1 perdent plus de poids (17 %) par rapport aux souris instillées par la souche PAO1 $\Delta$ kynA (7,5 %). La différence observée entre la souche PAO1 et PAO1 $\Delta$ kynA est significative ( $p = 0,0003$ ). Au cours d'une infection, la perte du poids résulte entre autre d'une perte d'eau par l'organisme. L'intensité de cette perte est liée à la sévérité de l'infection.

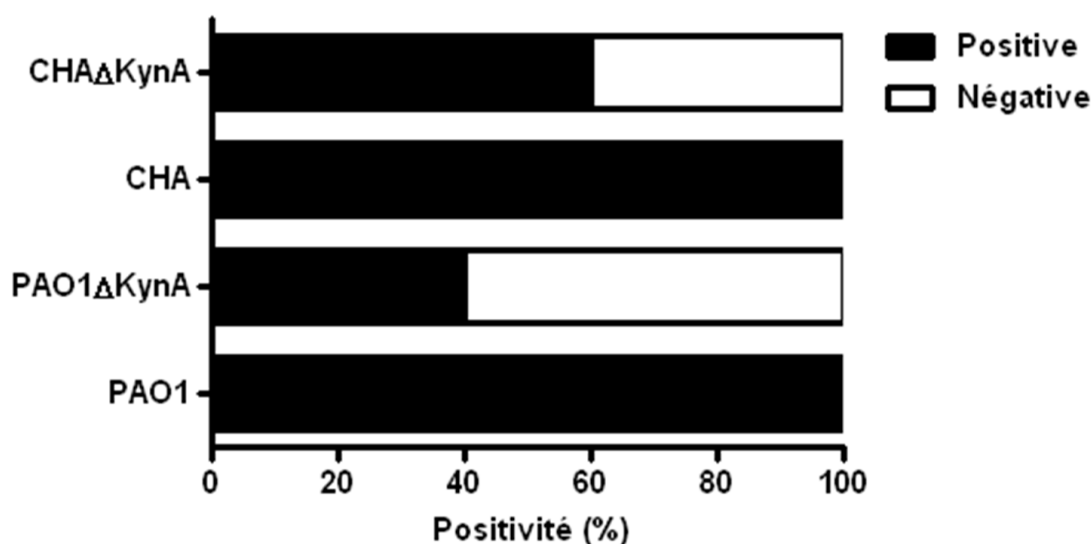
La figure 58. B montre que le ratio d'albumine marqué calculé pour les souris instillées par la souche PAO1 $\Delta$ kynA (1,5%) est très inférieur par rapport au ratio calculé dans les cas de de la souche PAO1 (4,5%). Ceci indique que la barrière alvéolo-capillaire dans le groupe de souris instillées par la souche PAO1 $\Delta$ kynA est moins perméable à l'albumine-FITC car elle est moins détériorée.

La figure 58. C montre que la clairance de la souche PAO1 $\Delta$ kynA est beaucoup plus importante. L'organisme arrive à éliminer cette souche plus facilement par rapport à la souche sauvage. 48 heures après l'infection, la charge bactérienne est plus importante dans les poumons des souris instillées par la souche sauvage. De ce fait, cette dernière est plus résistante aux mécanismes de défense de l'hôte.

La perte de poids, le degré de détérioration de la barrière alvéolo-capillaire et la clairance bactérienne sont liés à la sévérité de l'infection qui dépend, elle-même, de la virulence du pathogène. Comme la souche PAO1 $\Delta$ kynA ne produit pas de kynurénines (la seule différence entre la souche PAO1 et PAO1 $\Delta$ kynA), ces résultats indiquent que les kynurénines sont impliquées dans la virulence de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*.

Nous avons également étudié la dissémination bactérienne des quatre souches CHA, CHA $\Delta$ kynA, PAO1 et PAO1 $\Delta$ kynA dans les souris (figure 59). En effet, l'hémoculture est un reflet à un instant T du nombre de bactéries dans le sang (septicémie). Dans les modèles d'infection plus tardifs (24 heures – 48 heures), la translocation bactérienne est étudiée grâce à la rate, ce qui reflète la translocation bactérienne totale durant les 48 heures de l'infection. La figure 59 montre que les deux mutants CHA $\Delta$ kynA et PAO1 $\Delta$ kynA sont moins présents dans la rate par rapport aux deux souches sauvages. Ceci pourrait être expliqué par le fait que : i)

les souches mutées sont moins résistantes aux mécanismes de défense de l'hôte et elles sont éliminées plus facilement et ii) les lésions de la barrière alvéolo-capillaire sont moins importantes dont les bactéries traversent difficilement. Ces résultats renforcent le fait que les kynurénines sont importantes pour la virulence.



**Figure 59 : La translocation bactérienne.** Pour chacune des souches CHA, CHAΔ*kynA*, PAO1 et PAO1Δ*kynA*, un groupe de 6 souris a été instillé par un volume de 50μl, calibré pour contenir 10<sup>7</sup> bactéries (2.10<sup>8</sup> bactérie/mL). Les souris ont été sacrifiées 48 heures après l'instillation. Les rates sont prélevées et homogénéisées dans 1mL du SSI stérile. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur gélose BCP. Positive : % de souris dont la bactérie a été présente dans la rate; Négative : % de souris dont la bactérie n'a été présente dans la rate.

L'ensemble des résultats obtenus dans la partie 3 montrent que le mutant Δ*kynA* est beaucoup moins virulent. La souche Δ*kynA* dont la voie des kynurénines est interrompue ne produit presque pas de kynurénines. La clairance de ce mutant est plus importante par rapport aux autres souches. Il est à l'origine d'une faible lésion de la barrière alvéolo-capillaire et par conséquent, sa translocation dans le sang et la rate est très faible. Au cours d'une infection, le mutant Δ*kynA* est à l'origine d'une perte moins importante du poids ou de l'eau par l'hôte.

Les souches sauvages ainsi que le mutant Δ*kynU* produisent des kynurénines. Elles sont plus résistantes aux mécanismes de défenses de l'hôte et, sont difficilement éliminées. Ces souches sont à l'origine de fortes lésions de la barrière alvéolo-capillaire et par conséquent,

---

leurs translocation dans le sang et la rate est très importantes. Au cours d'une infection, ces souches persistent et sont à l'origine d'une perte importante du poids ou de l'eau par l'hôte.

Ces résultats indiquent que la voie des kynurénines est importante pour la virulence de *P. aeruginosa*. Le mutant  $\Delta kynU$  qui produit plus de kynurénines que la souche sauvage présente une virulence équivalente à celle-ci. Ceci présume que les effets mesurés ici sont bien dû à l'absence de la production de kynurénine car l'inactivation de la voie juste en aval de celle-ci ne produit pas d'atténuation notable de la virulence.

Une des questions qui reste à résoudre, est de savoir si la voie des kynurénines, chez la bactérie, possède un impact sur la réponse immunitaire. C'est ce que nous avons essayé de vérifier par la suite.

#### **4. Les kynurénines et la réponse immunitaire**

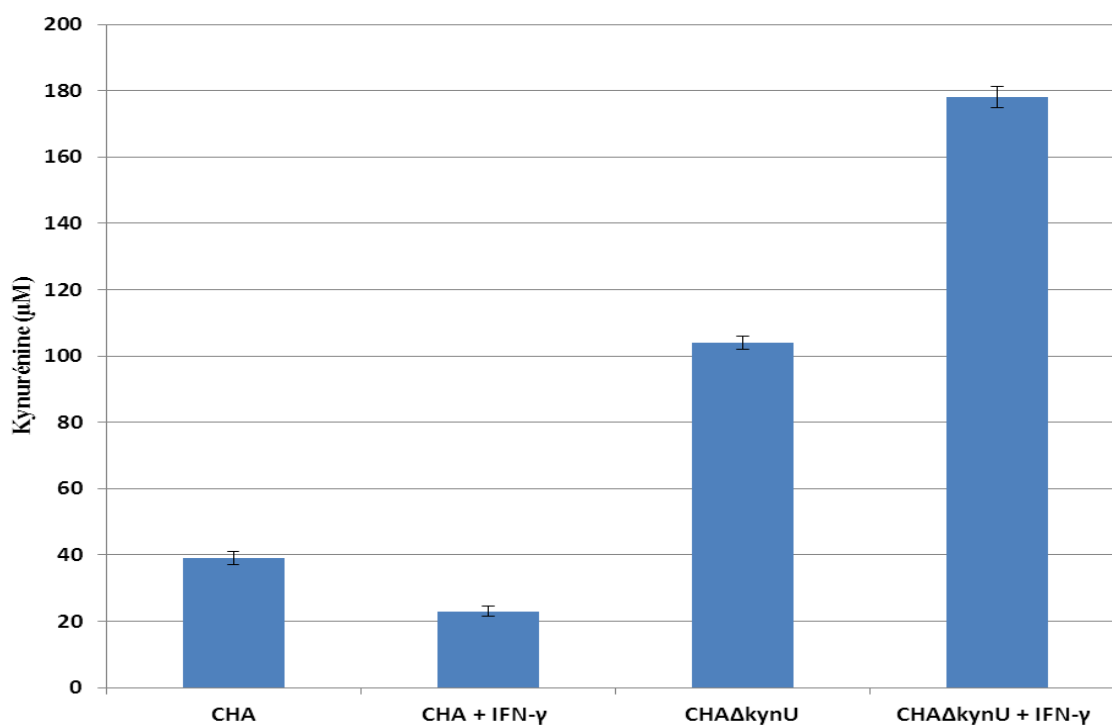
##### **4. 1. L'IFN- $\gamma$ stimule la production des kynurénines *in vitro***

Le système immunitaire de l'hôte reconnaît le pathogène *P. aeruginosa* après sa pénétration dans l'organisme via des interactions entre les deux. En effet, l'IFN- $\gamma$  est une cytokine produite par les lymphocytes, elle se fixe sur une protéine membranaire qui s'appelle OprF (Wagner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). À la suite de cette interaction, les défenses de l'hôte sont activées afin de neutraliser la bactérie. Cependant, cette interaction stimule la production de certains facteurs de virulence, modulant la réponse immunitaire de l'hôte, tels que la pyocyanine, la lectine PA-1L ainsi que les molécules du quorum sensing (Wagner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005).

Les kynurénines de l'hôte sont des immunomodulateurs et leur production est stimulée par l'IFN- $\gamma$  (Belladonna *et al.*, 2006; Belladonna *et al.*, 2009). C'est pour cela que nous nous sommes demandés si la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa* est également stimulée par l'IFN- $\gamma$ .

Pour se faire, du milieu LB avec ou sans l'IFN- $\gamma$  à 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a été inoculé à  $\text{DO}_{600} = 0,1$  à partir d'une culture de 16 heures pour chacune des deux souches CHA et  $\text{CHA}\Delta\text{kynU}$ . La kynurénine a été dosée à  $\text{DO}_{600} = 3,2$ .

La figure 60 montre que la quantité de la kynurénine accumulée par la souche CHA diminue de 40 % en présence de l'IFN- $\gamma$ . Pour la souche  $\text{CHA}\Delta\text{kynU}$ , cette quantité est le double en présence de l'IFN- $\gamma$ .



**Figure 60 : L'IFN- $\gamma$  stimule la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*.** Les deux souches CHA et CHA $\Delta$ kynU ont été cultivées à 37°C sous agitation de 250 rpm dans le milieu LB +/- 1,25  $\mu$ g/mL d'IFN- $\gamma$  humain. Des prélèvements ont été effectués à DO<sub>600</sub> = 3,2. Après une centrifugation à 10000g, du surnageant bactérien a été récupéré et filtré à 0,20  $\mu$ m. 100  $\mu$ L de ce dernier ont été mélangés avec 100  $\mu$ L du réactif d'Ehrlich Kovacs. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine, la concentration de cette dernière dans les différents échantillons a été déterminée. Les valeurs de la concentration représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

Ceci pourra être expliqué comme suit : l'IFN- $\gamma$  stimule les gènes de la voie des kynurénines et accélère les réactions métaboliques. De ce fait, la kynurénine produite par la souche sauvage est rapidement convertie en anthranilate et autres catabolites. Ceci permet de doser moins de kynurénines en présence de l'IFN- $\gamma$ . La délétion du gène *kynU* est à l'origine d'une accumulation de la kynurénine qui n'est pas convertie en anthranilate. En présence de l'IFN- $\gamma$ , la quantité de la kynurénine accumulée est quasiment le double car le gène *kynU* est délété et les gènes en amont sont fortement activés. Ces résultats indiquent que l'IFN- $\gamma$  induit, *in vitro*, les gènes de la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*. Ceci en jouant éventuellement son rôle de régulateur transcriptionnel comme c'est le cas dans les cellules dendritiques (Belladonna *et al.*, 2009; Orabona *et al.*, 2006).

#### 4. 2. Les kynurénines et la réponse immunitaire humorale

Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'effet des kynurénines bactériennes sur la réponse immunitaire humorale. Pour se faire, nous avons essayé de doser par ELISA, après infection, les anticorps dirigés contre la bactérie *P. aeruginosa*. Trois groupes de 6 souris chacun ont été infectés par voie sous-cutanée avec la souche sauvage CHA, CHA $\Delta$ kynA ou CHA $\Delta$ kynU. Pour les souris contrôle, du PBS a été injecté. Deux rappels ont été réalisés, le premier après une semaine et le deuxième après quatre semaines. À partir de trois souris par groupe, du sang a été prélevé, trois fois, par voie rétro-orbitale. Les trois prélèvements ont été réalisés 1 jour, 4 et 8 semaines après le dernier rappel. Par centrifugation, le sérum a été récupéré et gardé à -20°C. Par la technique ELISA, nous avons choisi de doser les anticorps dirigés contre trois protéines :

- La protéine OprF : une porine membranaire impliquées dans la virulence de *P. aeruginosa* (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011)
- L'exotoxine A (ExoA) : la toxine la plus puissante de *P. aeruginosa* (Gray *et al.*, 1984; Iglewski and Kabat, 1975; Perentesis *et al.*, 1992)
- La protéine PcrV : nécessaire pour l'assemblage du translocon du SSTT (Goure *et al.*, 2004; Goure *et al.*, 2005)

La figure 61 représente l'ensemble des résultats obtenus concernant le dosage des trois anticorps.

**Anti-ExoA**, pour les trois prélèvements :

- Souris infectées par CHA : 67% des titres sont supérieurs ou égaux à 4000 (pour les trois prélèvements) dont deux titres de 132000 et deux autres de 32000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynA : 22 % des titres sont supérieurs ou égaux à 4000 dont un titre de 32000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynU : 22 % des titres sont supérieurs ou égaux à 4000 dont deux titres de 132000

**Anti-OprF**, pour les trois prélèvements :

- Souris infectées par CHA : 22 % des titres sont supérieurs ou égaux à 4000 dont un titre de 132000 et un autre de 14000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynA : tous les titres sont inférieurs à 4000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynU : tous les titres sont inférieurs à 4000

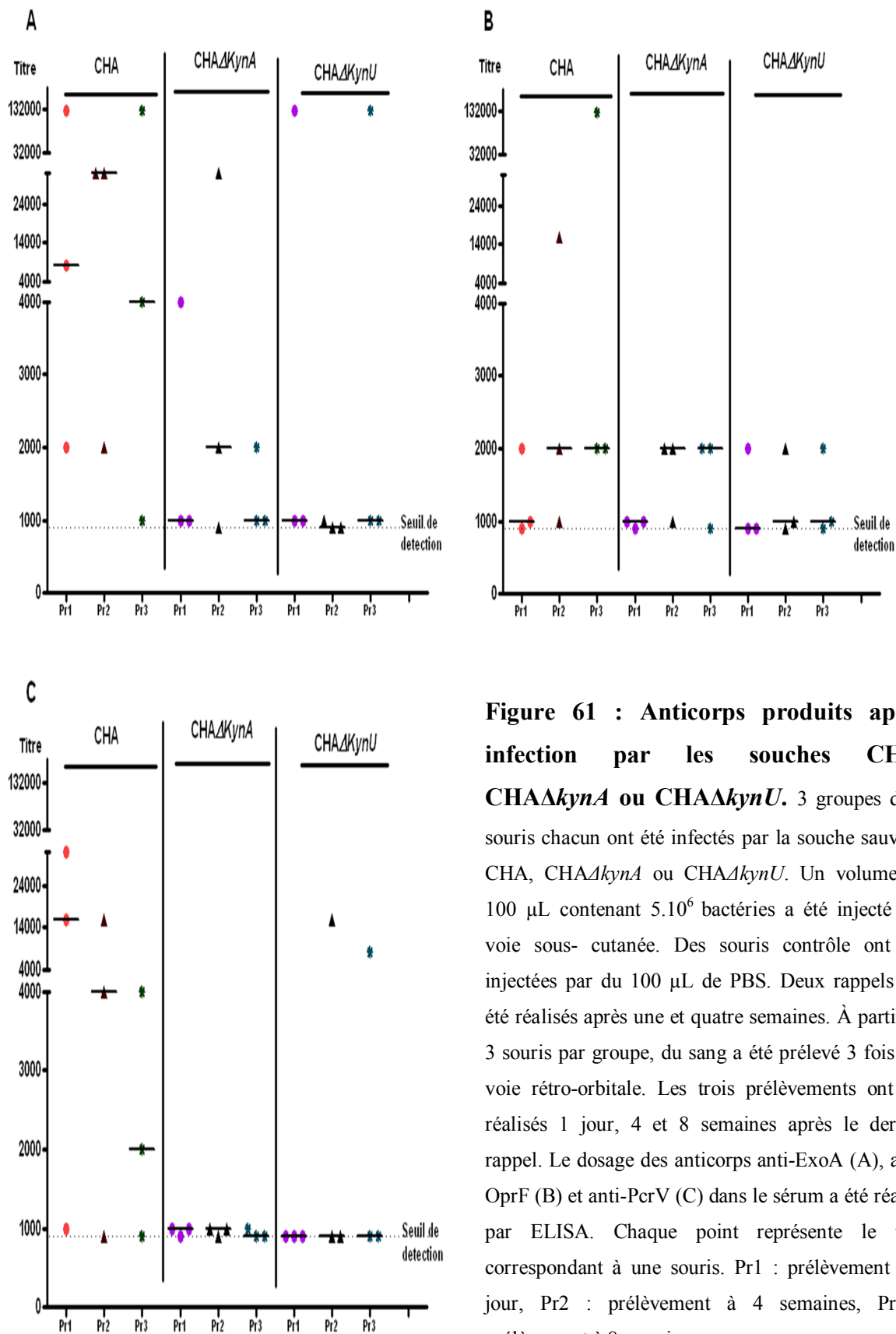


**Anti-PcrV**, pour les trois prélèvements :

- Souris infectées par CHA : 56 % des titres sont supérieurs ou égales à 4000 dont un titre de 32000 et deux autres de 16000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynA : tous les titres sont inférieurs à 4000
- Souris infectées par CHA $\Delta$ kynU : 22 % des titres sont supérieurs ou égales à 4000 dont un titre de 14000

Ces résultats ne permettent pas de comparer les trois prélèvements à cause des différentes tendances observées d'une protéine à l'autre et d'une souche à l'autre pour le même prélèvement. Néanmoins, il semble que la souche sauvage CHA induit la production de plus d'anticorps par rapport à la souche CHA $\Delta$ kynA. Ceci est compatible avec les résultats précédents (partie 3) indiquant que la souche CHA $\Delta$ kynA est moins virulente. Par conséquent, elle provoque une réponse immunitaire moins forte et donc la production de moins d'anticorps. Bien que les deux souches CHA et CHA $\Delta$ kynU ont une virulence comparable, la souche CHA $\Delta$ kynU, surproduisant des kynurénines, induit la production de moins d'anticorps par rapport à la souche CHA. Ceci pourrait être lié à la présence d'une forte concentration en kynurénines qui induisait un contrôle négatif de la réponse immune diminuant la production des anticorps.

- Ceux ne sont que des essais préliminaires qui semblent être prometteurs et qui restent à optimiser par l'utilisation notamment de plus de souris et employer des techniques plus adaptées.



**Figure 61 : Anticorps produits après infection par les souches CHA, CHAΔkynA ou CHAΔkynU.** 3 groupes de 6 souris chacun ont été infectés par la souche sauvage CHA, CHAΔkynA ou CHAΔkynU. Un volume de 100 μL contenant 5.10<sup>6</sup> bactéries a été injecté par voie sous-cutanée. Des souris contrôle ont été injectées par du 100 μL de PBS. Deux rappels ont été réalisés après une et quatre semaines. À partir de 3 souris par groupe, du sang a été prélevé 3 fois par voie rétro-orbitale. Les trois prélèvements ont été réalisés 1 jour, 4 et 8 semaines après le dernier rappel. Le dosage des anticorps anti-ExoA (A), anti-OprF (B) et anti-PcrV (C) dans le sérum a été réalisé par ELISA. Chaque point représente le titre correspondant à une souris. Pr1 : prélèvement à 1 jour, Pr2 : prélèvement à 4 semaines, Pr3 : prélèvement à 8 semaines.

---

L'ensemble des résultats obtenus dans la partie 4 montre que la voie bactérienne des kynurénines est régulée par l'IFN- $\gamma$  humain. Une souche productrice de kynurénines semble déclencher la production de plus d'anticorps. En effet, il est possible que les kynurénines bactériennes soient des modulateurs de la réponse immunitaire.

## 5. Discussion

Afin de survivre au cours des infections, *P. aeruginosa* utilise différentes sources de carbone dont le tryptophane et produit un grand nombre de métabolites secondaires (Kersten and Dorresteijn, 2009; Lepine *et al.*, 2004, Matthijs *et al.*, 2004; Ramos, 2004; Sullivan *et al.*, 2011). Une des voies du catabolisme du tryptophane aboutit à la formation des kynurénines. Ces molécules sont également produites par l'hôte à partir du tryptophane (Juhás *et al.*, 2005; Zelante *et al.*, 2009). Il est connu que les kynurénines de l'hôte sont des immunomodulateurs (Belladonna *et al.*, 2009). Concernant les kynurénines bactériennes, peu ou pas d'études ont été réalisées pour mettre en œuvre un éventuel rôle d'immunomodulation ou dans la virulence. C'est la raison pour laquelle, nous avons entrepris des études pour savoir si les kynurénines bactériennes sont impliquées dans la virulence de *P. aeruginosa* d'une part, et vérifier un éventuel rôle d'immunomodulateur d'autre part. Le tryptophane est le précurseur de nombreuses molécules signal tel que l'indole-3-acetic acid (IAA), la kynurenine et les Pseudomonas quinolone signal (PQS).

Nous avons validé un test colorimétrique de dosage des kynurénines grâce au réactif d'Ehrlich Kovacs. Ceci nous a permis de confirmer le fait que *P. aeruginosa* produit de la kynurénine et qu'elle a été dosée dans le milieu de culture de différentes souches.

Nous avons constaté qu'une inactivation du gène *kynA* est à l'origine d'une disparition de la production de kynurénine. Ceci indique que la tryptophane 2,3-dioxygénase est l'enzyme clé de la voie de synthèse des kynurénines. La souche CHA $\Delta$ *kynU* est à l'origine d'une énorme accumulation des kynurénines. Comme le gène *kynU* est inactivé, la kynurénine produite ne sera pas transformée en anthranilate ou autres métabolites (figure 41). Bien que le milieu de culture utilisé contienne du tryptophane (milieu LB), les quantités de kynurénine accumulées pour les deux souches CHA et CHA $\Delta$ *phnAB* étaient différentes. La souche CHA $\Delta$ *phnAB* produit normalement moins d'anthranilate par rapport à la souche sauvage. Pour augmenter sa production, il est possible que l'anthranilate pratique un contrôle positif accélérant la transformation de la kynurénine en anthranilate, surtout que ce dernier est le

---

précurseur du PQS impliqué dans la virulence (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher and Manoil, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2006). L'inactivation du gène *kynB* est à l'origine d'une augmentation de la quantité de kynurénine accumulée par rapport à la souche sauvage. En effet, la tryptophane 2,3-dioxygénase, codée par le gène *kynA*, transforme le tryptophane en formylkynurenine. Ce dernier est converti en kynurénine par la kynurenine formamidase (gène *kynB*) ou en formylanthranilate par la kynureninase (gène *kynU*) (figure 41). Donc, la délétion du gène *kynB* est à l'origine d'une accumulation de la formylkynurenine dont une partie est convertie en formylanthranilate. En outre, il est possible que la formylkynurenine puisse être métabolisée par une voie autre que celle des kynurénines. En effet, Farrow et Pesci (Farrow and Pesci, 2007) ont montré que la souche CHAΔ*kynA* ne produit pas de PQS mais la souche CHAΔ*kynB* en produit une petite quantité. Ils ont également (Farrow and Pesci, 2007) montré que la kynurénine stimule sa propre synthèse, donc l'absence de la kynurénine diminue sa propre production. Ces résultats apportent des preuves supplémentaires renforçant l'enchaînement des différentes étapes de biosynthèse et dégradation des kynurénines proposées dans la figure 41. Néanmoins, d'autres études sont encore nécessaires pour bien cerner cette voie notamment en inactivant d'autres gènes et en dosant les métabolites appropriés. En cultivant *P. aeruginosa* dans un milieu chimiquement défini avec ou sans tryptophane, nous avons confirmé que cet acide aminé est indispensable pour produire des kynurénines. Ceci a été également observé par Farrow et Pesci (Farrow and Pesci, 2007). Bien que *P. aeruginosa* a la capacité de synthétiser du tryptophane à partir du chorismate (figure 41), la quantité de kynurénine accumulée en absence du tryptophane était nulle. Ceci indique qu'en cas de limitation métabolique, la voie des kynurénines n'est pas activée et la bactérie synthétise du tryptophane mais l'utilise pour alimenter d'autres voies métaboliques bien plus importantes que la voie des kynurénines.

En utilisant des fusions transcriptionnelles, nous avons constaté que le tryptophane et la kynurénine régulent positivement l'expression du gène *kynA*. Donc, la kynurénine active sa propre synthèse. Récemment, Knoten et ses collègues (Knoten *et al.*, 2011) ont montré que la kynurénine stimule sa propre synthèse via un nouvel activateur transcriptionnel s'appellant KynR codé par le gène *kynR* (PA2082). Ceci explique la vitesse élevée d'accumulation de la kynurénine dans le mutant CHAΔ*kynU*. En utilisant des fusions traductionnelles, Farrow et Pesci ont constaté des phénomènes similaires (Farrow and Pesci, 2007). Par conséquent, il est possible que les métabolites de la voie des kynurénines régulent l'expression des gènes

---

incriminés. L'expression des deux gènes *kynA* et *kynU* est plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance. En effet, au cours de cette phase la bactérie est très active. *In vivo*, ceci pourrait correspondre à l'état d'une infection aiguë pendant laquelle la bactérie exprime un vaste arsenal de facteurs de virulence dont le PQS afin de pouvoir s'installer dans les tissus de l'hôte. Une expression élevée des deux gènes *kynA* et *kynU* au cours de cette phase a probablement pour but de produire le PQS impliqué dans la virulence de la bactérie (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher and Manoil, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2006). En effet, la voie des kynurenines est essentielle pour la production du PQS via l'antranilate, à partir du tryptophane (Farrow and Pesci, 2007). Cette voie est la source principale de l'antranilate chez *P. aeruginosa* (Farrow and Pesci, 2007, Palmer *et al.*, 2005). Au cours de la phase stationnaire, l'expression du gène *kynU* diminue plus rapidement par rapport au gène *kynA*. Ceci indique que la bactérie produit plutôt des kynurénines que du PQS. *In vivo*, cette phase pourrait correspondre à un état chronique de l'infection et la bactérie continue à contourner les défenses immunes de l'hôte grâce aux kynurénines afin de pouvoir persister. Donc, il est possible que les kynurénines produites modulent la réponse immunitaire de l'hôte au profit de la bactérie. D'autre part, ces résultats montrent également que la bactérie module la voie métabolique des kynurénines en fonction de son environnement.

Comme l'IFN- $\gamma$  stimule l'expression des gènes de la voie des kynurénines chez les eucaryotes (Belladonna *et al.*, 2006 ; Belladonna *et al.*, 2009), nous avons vérifié si cela est vrai pour la voie des kynurénines bactérienne. En fait, nous avons remarqué que la quantité de la kynurénine accumulée, par le mutant  $CHA\Delta kynU$ , en présence de l'IFN- $\gamma$  est plus importante. Pour la souche sauvage cette quantité a diminué. Il est donc possible que l'IFN- $\gamma$  stimule l'expression des gènes de la voie des kynurénines. Pour confirmer ce résultat, il est nécessaire d'étudier l'expression des gènes de la voie en présence de l'IFN- $\gamma$ . Le contact de la bactérie avec le sérum humain ou certaines cellules de l'immunité active l'expression du gène *kynA*. Ceci est probablement dû à la fixation des anticorps ou de certains composants du complément (C3B, C4B...) à la bactérie. Cette fixation induit probablement le régulateur transcriptionnel KynR qui active la transcription des gènes de la voie des kynurénines (Knoten *et al.*, 2011). Donc, au cours du dialogue interrègne bactérie/hôte, la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est stimulée par certains composants du système immunitaire.

Des études, *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë ont permis de comparer la virulence des trois souches : sauvage, le mutant  $\Delta kynA$  et le mutant  $\Delta kynU$ . Les

résultats confirment bien un rôle important joué par les kynurénines dans la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, nous avons constaté que l'infection est plus sévère pour les deux souches produisant des kynurénines. Elles étaient à l'origine d'une :

- Détérioration de la barrière alvéolo-capillaire plus importante, lié notamment aux enzymes libérées par la bactérie telles que les protéases
- Perte de poids de l'hôte plus importante à cause d'une perte de l'eau
- Leur clairance et dissémination dans l'organisme sont fortes. Ceci indique qu'elles persistent et résistent aux défenses de l'hôte. Ceci confirme le fait que les kynurénines bactériens pourraient moduler la réponse immune.

Ces travaux ont confirmé la production des kynurénines par *P. aeruginosa* via la voie initiée par la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) codée par le gène *kynA*. Ces molécules régulent leur synthèse et sont importantes, au cours de la phase aiguë de l'infection, pour la virulence de la bactérie. Au cours de la phase chronique, il semble que les kynurénines bactériennes jouent un rôle de modulateur de la réponse immunitaire. Ceci afin de garantir la persistance de la bactérie. D'autres travaux sont nécessaires afin de comprendre le rôle joué par les kynurénines dans le dialogue inter-règne impliquant la bactérie *P. aeruginosa* et son hôte, d'une part pour comprendre comment ces molécules sont impliquées dans la virulence et d'autre part, pour comprendre les mécanismes par lesquels ces molécules modulent la réponse immune.



---

### **Chapitre 3 : La protéine OprF et la virulence de *Pseudomonas aeruginosa***

La troisième partie de mon projet de thèse vise à la caractérisation d'une nouvelle cible, la protéine OprF.

OprF est une porine membranaire de 38kDa composée de 350 acides aminés, homologue à la protéine OmpA d'*E. coli*. Elle constitue la protéine la plus abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa* (cf. introduction, paragraphe 7. 2. 5. ). Des études *in vivo* indiquent que la protéine OprF permettrait à la bactérie d'évaluer l'état d'activation du système immunitaire de son hôte, par fixation de l'IFN- $\gamma$  afin d'adapter sa virulence (Wu *et al.*, 2005), et qu'elle serait la cible préférentielle de l'élastase produite par les neutrophiles (Hirche *et al.*, 2008). Une étude récente (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011), à laquelle nous avons participé, a montré que la protéine OprF est importante pour la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*. Étant donnée l'importance de la protéine OprF pour cette bactérie, elle représente un candidat intéressant pour le développement d'une thérapie anti *P. aeruginosa*.

#### **1. La protéine OprF est impliquée dans l'expression du SSTT**

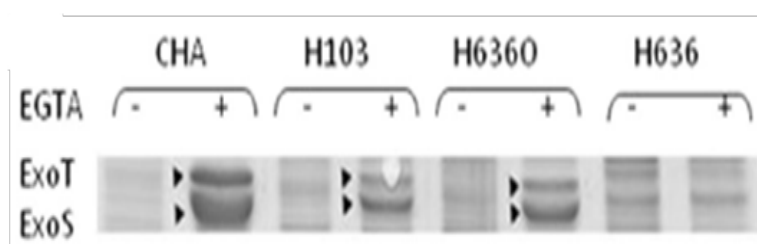
Dans l'étude de Fito-Boncompagni et ses collègues (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011), plusieurs tests ont été réalisés afin d'évaluer l'importance d'OprF dans la virulence de *P. aeruginosa*. De notre côté, nous avons vérifié si la protéine OprF est importante pour le fonctionnement du SSTT.

Pour se faire, nous avons utilisé le plasmide *pexsAind* (figure 21) contenant le gène *exsA* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG et le gène codant pour la fusion protéique ExoS-GP100. GP100 (protéine humaine) est utilisée ici comme un marqueur de la sécrétion (Derouazi *et al.*, 2008). Un test de sécrétion a été réalisé selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes. En bref, la souche CHA et les souches de PAO1 : H103 (souche sauvage), H636 (souche  $\Delta oprF$ ), H636O (mutant H103 $\Delta oprF$  complétementé par un plasmide *poprF*) H103 (*pexsAind*) et H636(*pexsAind*) ont été cultivées sous les conditions d'activation du SSTT (+ l'IPTG pour les souches contenant le plasmide *pexsAind*). Les surnageants et les culôts bactériens ont été normalisés par rapport à la DO<sub>600</sub> et les protéines ont été précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA). Les protéines ont été séparées par un gel SDS-PAGE de 15% et révélées par le bleu de Coomassie. Une immunodétection (western



blot) des protéines ExoS, ExoT et ExoS-GP100 a été réalisée grâce à un anticorps anti-ExoS/T (fournis par I. Attree, Grenoble, France).

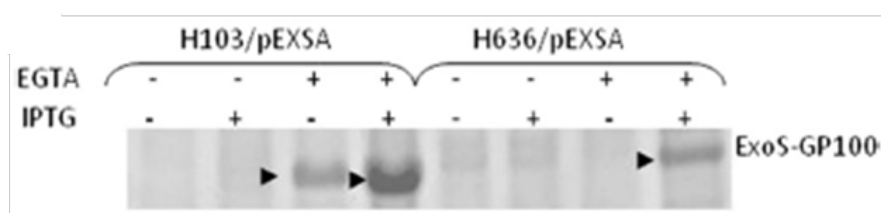
Les figures 62, 63, 64 et 65 montrent que la mutation  $\Delta oprF$  est à l'origine d'une altération de la sécrétion de type 3. La sécrétion de nombreuses protéines a été induite quand les souches H103 et H636O ont été cultivées en condition d'activation du SSTT par déplétion calcique (figure 62, EGTA). Deux de ces protéines sont des effecteurs du SSTT (ExoS et ExoT). Le mutant  $\Delta oprF$  n'a pas la capacité de sécréter les deux effecteurs ExoS et ExoT, même en condition de déplétion calcique (figure 62). Ceci indique que l'activité du SSTT est abolie en absence de la protéine OprF. D'autre part, pour les mêmes conditions, la croissance et la viabilité des souches utilisées n'ont pas été affectées, ce qui indique que l'altération de la fonction du SSTT ne peut pas être attribuée à un défaut de croissance ou de viabilité (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011). Cette anomalie dans la fonction du SSTT pourrait résulter d'un défaut de l'expression des gènes du SSTT.



**Figure 62 : La mutation  $\Delta oprF$  réduit la sécrétion de type trois.** Les souches CHA, H103, H636 et H636O ont été cultivées sous les conditions d'induction (EGTA+) ou de non induction (EGTA-) du SSTT jusqu'à une  $OD_{600}$  de 1,5. Les surnageants ont été normalisés et précipités au TCA. Les protéines extracellulaires ont été séparées par un SDS-PAGE à 15% et marquées par le bleu de Coomassie. Les bandes correspondant aux exotoxines (ExoS et ExoT) sont indiquées par des flèches noires. L'expérience a été refaite trois fois.

Comme ExsA est l'activateur transcriptionnel de tous les gènes du SSTT dont les effecteurs, nous avons vérifié si une augmentation du niveau d'ExsA (possible grâce au plasmide *pexsAInd* qui permet l'induction par l'IPTG de l'expression d'*exsA*) restaure l'activité du SSTT dans la souche H636. Les souches ont été cultivées sous les conditions d'induction (avec EGTA) ou non induction (sans EGTA) du SSTT, et sous les conditions d'induction (avec IPTG) ou non induction (sans IPTG) d'*exsA* en trans. La figure 63 montre que la protéine de fusion ExoS-GP100 a été détectée dans le surnageant de la souche H103(*pexsAInd*) sous les conditions d'induction du SSTT et en absence d'IPTG, ce qui

confirme que le niveau d'expression du gène *exsA* chromosomal est suffisant dans la souche sauvage. L'ajout d'IPTG dans la culture de la souche H103(*pexsAind*) sous les conditions d'induction du SSTT est à l'origine d'une large augmentation de la protéine ExoS-GP100 secrétée. Au contraire, la sécrétion de la protéine ExoS-GP100 par la souche H636(*pexsAind*) nécessite l'induction à l'IPTG de l'expression en trans du gène *exsA*. Ceci indique que l'altération du fonctionnement du SSTT dans le mutant  $\Delta oprF$  pourrait être restaurée par une expression en *trans* d'*exsA*.

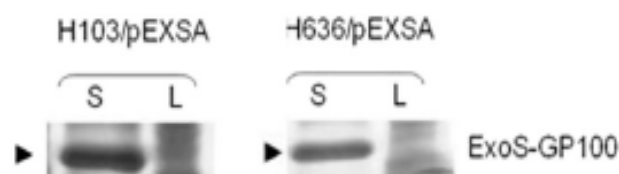


**Figure 63 : La surexpression d'*exsA* restaure l'activité du SSTT en absence de la protéine OprF.** La souche sauvage H103/pEXSA et le mutant H636/pEXSA expriment ExsA grâce à promoteur inducible par l'IPTG se trouvant sur le plasmide *pexsAind*. Ce plasmide contient également le gène codant une protéine de fusion ExoS-GP100. Les souches ont été cultivées sous les conditions d'induction (EGTA+) ou de non induction (EGTA-) du SSTT et, avec ou sans l'IPTG à 0.5 mM, jusqu'à une OD<sub>600</sub> de 1,5. Les protéines extracellulaires ont été séparées par un SDS-PAGE à 15% et marquées par le bleu de Coomassie. Les flèches noires correspondent à la protéine secrétée ExoS-GP100. L'expérience a été refaite trois fois.

Il serait légitime d'émettre l'hypothèse que la mutation OprF se traduit par une désorganisation de la membrane externe de la bactérie, désorganisation qui pourrait avoir comme conséquence un blocage de la sécrétion par le SSTT et donc de l'activation de son expression (qui nécessite une bonne fonctionnalité comme décrit dans la partie introduction). Les figures 64 et 65 montrent que les effecteurs ExoS/T sont présents en grande quantité dans le surnageant de la souche H636, mais pas dans le lysat cellulaire. Si la mutation OprF se traduisait uniquement par un défaut dans la structure de la membrane de la bactérie et donc une altération de la fonctionnalité du SSTT on aurait des effecteurs dans le cytosol du mutant OprF (H636), ce qui n'est pas le cas. Par conséquent, il est plausible d'affirmer que dans le mutant OprF les gènes du SSTT et des effecteurs ne sont pas exprimés à un niveau suffisant pour être détectés.

Ces résultats ont mis en évidence l'importance de la porine OprF pour le fonctionnement du SSTT, un facteur de virulence majeur de *P. aeruginosa*. Comme OprF

semble aussi être impliqué dans l'expression de nombreux autres facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011) et dans l'adaptation à l'immunité de l'hôte, nous avons décidé de développer des anticorps monoclonaux contre cette protéine de surface de la bactérie dans le but de disposer d'une nouvelle approche thérapeutique.



**Figure 64 : En absence d'OprF, ExoS-GP100 n'est pas séquestrée dans le cytoplasme.** Les deux souches H103(*pexsAind*) et H636(*pexsAind*) ont été cultivées sous les conditions d'induction avec l'IPTG et l'EGTA. Les protéines des surnageants normalisés et précipités au TCA (bande S) ou des lysats cellulaires (bande L) ont été séparées par un SDS-PAGE à 15% et marquées avec le bleu de Coomassie. Les flèches noires correspondent à la protéine sécrétée ExoS-GP100. L'expérience a été refaite deux fois.



**Figure 65 : Les exotoxines ExoS/ExoT ne sont pas accumulées dans le cytoplasme du mutant  $\Delta oprF$ .** Des Western blots des surnageants (bande S) et des lysats cellulaires (bande L) issus de cultures sous les conditions d'induction ont été réalisés. La révélation a été effectuée avec un anti-ExoS/ExoT.

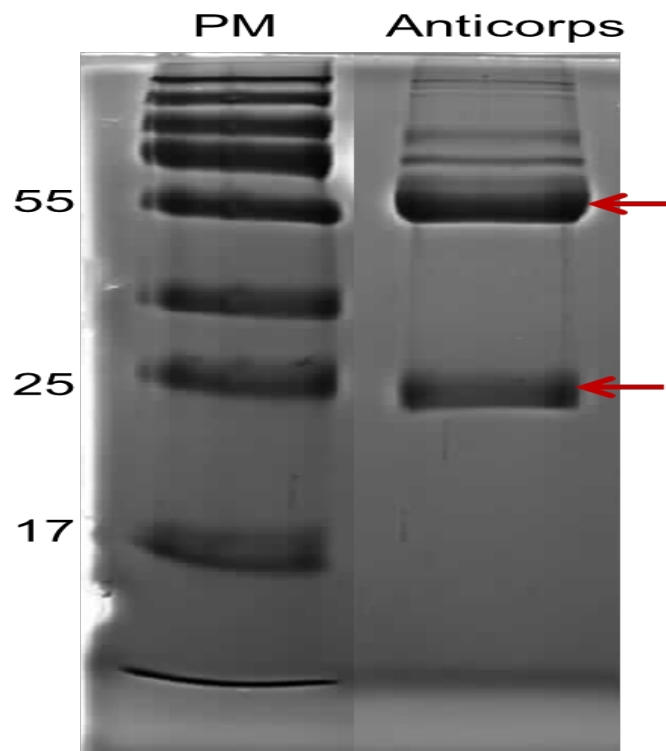
## 2. Production d'un anticorps anti-OprF

L'obtention des anticorps monoclonaux anti-oprF a été réalisée par la technique de fusion cellulaire décrite par Köhler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975) et clonage en dilution-limite. C'est une technique basée sur la fusion d'un lymphoblaste activé par l'antigène d'intérêt et d'une cellule myéломateuse SP2O. L'antigène utilisé était un protéoliposome recombinant obtenu au laboratoire (Bruno Marques, thèse de l'Université Joseph Fourier, 2010). L'immunisation et le criblage des hybridomes ont été réalisés sous la direction du Dr Habib (UVHCI, EMBL, Grenoble). Après le clonage des hybridomes positifs,

l'isotypage des anticorps a été réalisé et trois clones ont été caractérisés : isotype IgG2b,  $\lambda$ , IgG2a,  $\lambda$  et IgG1.

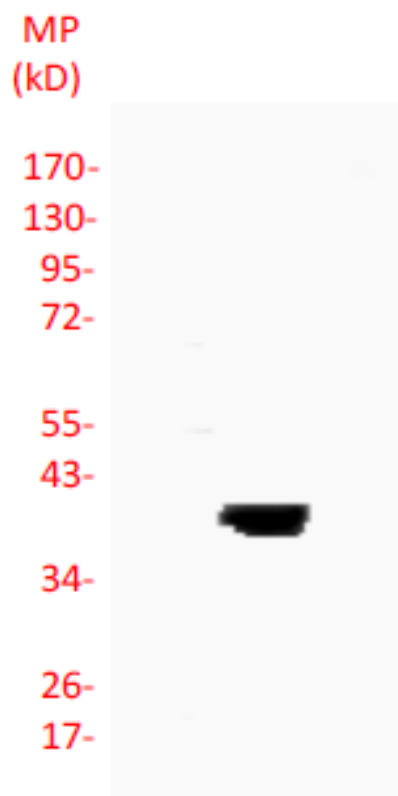
Par la suite, nous avons essayé de produire les anticorps correspondant à l'isotype IgG2b,  $\lambda$ . En effet, le clone d'intérêt a été injecté à des souris Balb/C sensibilisées au pristane afin de produire des ascites : les clones produisant l'anticorps anti-oprF sont mélangés avec l'adjuvant complet de Freund et injectés par voie intra-péritonéale. Après 7 jours, des volumes d'ascite de 8 mL en moyenne pour le premier prélèvement et de 6 mL pour le second sont récoltés par ponction. Les anticorps ainsi produits ont été purifiés par chromatographie en utilisant une colonne Protein A et selon le protocole du fabricant (Sigma, St. Louis, MO).

Une analyse de ces anticorps a été réalisée par un SDS-PAGE à 12%. La figure 66 montre bien les deux chaînes de l'anticorps (flèches rouges) : la chaîne lourde correspondant à une taille de 55 kDa et la chaîne légère avec une taille de 25 kDa. La concentration de l'anticorps a été estimée à 1 mg/mL.



**Figure 66 : SDS-PAGE des anticorps anti-OprF.** Les anticorps anti-OprF purifiés ont été analysés par un SDS-PAGE à 12% et sont marqués avec le bleu de Coomassie. Les flèches rouges correspondent aux chaînes lourde (taille de 55 kDa) et légère (taille de 25 kDa) de l'anticorps. PM : poids moléculaire en kDa.

Un anticorps ayant été produit et purifié, nous avons voulu évaluer sa capacité à reconnaître la protéine OprF. Pour se faire, une immunodétection (western blot) a été réalisée (cf. partie matériel et méthodes). La figure 67 montre que l'anticorps produit se révèle capable de reconnaître spécifiquement la protéine OprF. Donc, l'anticorps produit est bien spécifique de la porine membranaire OprF de *P. aeruginosa*.



**Figure 67 : L'anticorps produit reconnaît la protéine OprF.** Western blot anti-OprF réalisé avec les anticorps produits et purifiés dirigés contre la protéine OprF. L'anticorps a été dilué au 1/10000 et nous avons utilisé 100ng de la protéine OprF.

### 3. Discussion

Trouver de nouvelles thérapies anti-infectieuses représente une nécessité majeure car la plupart des pathogènes dont *P. aeruginosa*, développent des résistances aux antibiotiques. Nous avons décidé de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre la porine membranaire OprF afin de neutraliser la bactérie. Cette porine constitue la protéine la plus abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'importance de cette porine pour la virulence de *P. aeruginosa* et notamment dans le fonctionnement du SSTT, facteur de

virulence majeur de la bactérie. En effet, la production mais vraisemblablement pas la sécrétion des exotoxines ExoT et ExoS est altérée dans le mutant  $\Delta oprF$ . Ceci est probablement dû à une absence d'expression du gène natif *exsA* dans le mutant  $\Delta oprF$ . En outre, une grande partie de la régulation du SSTT se situe en aval de l'action d'ExsA et via des circuits complexes de régulation post-transcriptionnelle employant des petits ARN (cf. introduction). Il est donc possible qu'au moins une partie de ces circuits soit altérée dans le mutant  $\Delta oprF$  même après l'induction d'ExsA. D'autre part, la protéine OprF s'est révélée importante pour la production d'autres facteurs de virulences tels que : la pyocyanine, l'élastase, la lectine PA-1L et l'exotoxine A. Elle est également nécessaire pour l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011) et pour l'adaptation à la réponse immunitaire. Par conséquent, cette protéine représente une cible thérapeutique majeure. C'est la raison pour laquelle nous avons essayé de produire des anticorps anti-OprF.

L'obtention des anticorps monoclonaux anti-OprF a été réalisée par la technique de fusion cellulaire décrite par Köhler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975) et clonage en dilution-limite. Nous avons obtenu 3 clones différents produisant des immunoglobulines d'isotypes différents. Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur le clone qui produisait l'anticorps le plus affiné pour OprF. Un western blot a été réalisé et l'anticorps s'est révélé capable de reconnaître spécifiquement la protéine OprF à des dilutions assez faibles. Les expériences de neutralisation *in vitro* puis *in vivo* seront bientôt initiées.

- *in vitro*, sur des bactéries en culture afin de vérifier l'action de l'anticorps sur l'activité du SSTT ou sur des bactéries en co-culture avec des cellules de l'hôte (macrophages, neutrophiles, cellules épithéliales...etc.) afin de vérifier si la bactérie reste cytotoxique en présence des anticorps.
- *in vivo*, dans un modèle murin d'infection.



*Partie 4 :*

***Conclusion et Perspectives***





Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* possède un vaste arsenal de facteurs de virulence. Le SSTT est un facteur de virulence majeur et extrêmement performant. Il permet à la bactérie d'échapper aux défenses immunitaires en particulier en injectant des effecteurs toxiques directement dans le cytoplasme des cellules de l'immunité (Frank, 1997; Hueck, 1998; Yahr *et al.*, 1995). La mise en place et l'utilisation de ce système de virulence nécessite un coût énergétique considérable. En contrepartie, la bactérie a mis en place une régulation extrêmement fine tant au niveau de l'expression des gènes qu'à celui de l'utilisation de ce système. Ceci fait de ce facteur de virulence l'un des éléments clés, du processus de colonisation d'un organisme par *P. aeruginosa* puis de sa propagation au sein de cet hôte. C'est notamment le cas lors du développement d'infections pulmonaires, en particulier chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Par conséquent, développer de nouvelles thérapies ciblant ce facteur de virulence est d'une importance considérable. La porine membranaire OprF représente la protéine la plus abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Une étude récente (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011) a montré que OprF est importante pour la régulation de la virulence de la bactérie. Elle permettrait à la bactérie d'évaluer l'état d'activation du système immunitaire de son hôte, par fixation de l'IFN- $\gamma$  afin d'adapter sa virulence (Wu *et al.*, 2005). Donc, la porine OprF représente également un candidat intéressant pour le développement d'une thérapie anti *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* utilise différentes sources de carbone dont le tryptophane. Cet acide aminé est le précurseur de nombreuses molécules signal telles que l'acide indole-3-acétique (AIA), les Pseudomonas quinolone signal (PQS) et les kynurenines (Kersten and Dorrestein, 2009; Lepine *et al.*, 2004, Matthijs *et al.*, 2004; Patten and Glick, 2002; Ramos, 2004; Sullivan *et al.*, 2011). Ces dernières sont également produites par l'hôte à partir du tryptophane (Juhas *et al.*, 2005; Zelante *et al.*, 2009) et sont des immunomodulateurs (Belladonna *et al.*, 2009). Peu ou pas d'études ont été réalisées pour mettre en œuvre un éventuel rôle d'immunomodulation ou dans la virulence des kynurénines bactériennes. Démontrer ceci est un des enjeux importants dans la recherche de nouvelles thérapies contre *P. aeruginosa*.

### **Autorépression du système de sécrétion de type 3 de *P. aeruginosa***

Le laboratoire a mis en évidence une nouvelle voie réprimant le SSTT de *P. aeruginosa* (Dakang Shen, Thèse de l'université Joseph Fourier, 2006; Didier Filopon, Thèse de

l'université Joseph Fourier, 2005). En effet, on a constaté une diminution de l'expression de ce système en fin de la phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire de croissance. Un signal d'autorépression secrété est alors à l'origine de cette diminution. Ce signal a été nommé PARST, pour « *Pseudomonas* Auto Repressor of Secretion Three ». Il a été démontré que ce dernier est différent des signaux du quorum sensing classique et sa production est dépendante de la densité cellulaire et du tryptophane (Shen *et al.*, 2008).

Dans la première partie de cette étude, nous avons cherché à comprendre le mécanisme d'action du PARST. En fait, nous avons voulu vérifier si ce dernier agit en amont ou en aval de l'action d'ExsA, l'activateur transcriptionnel de l'ensemble des gènes du SSTT. Nous avons montré que le PARST exerce une régulation post-transcriptionnelle en plus d'une inhibition de la transcription des gènes du SSTT. En effet, en absence de ce signal, les exotoxines sont secrétées mais en sa présence, elles ne sont pas détectées ni dans le surnageant ni dans le lysat cellulaire même lorsque l'activité transcriptionnelle est très forte grâce à une expression *en trans* d'*exsA*. Il est possible que ce signal d'autorépression soit à l'origine d'une perturbation de la traduction et une dégradation des ARN messagers. Plusieurs modèles de régulation post-transcriptionnelle ont été proposés (Ventre *et al.*, 2006, Goodman *et al.*, 2004, Heurlier *et al.*, 2004) afin d'expliquer les mécanismes à l'origine de l'inactivation de certains facteurs de virulence dont le SSTT. Les acteurs de ces modèles sont essentiellement des petits ARN non codants et des systèmes à deux composantes tels que LadS, RetS et GacS/A. Ces systèmes sont impliqués dans la transition entre une infection aiguë et l'infection chronique. En effet, lors de cette transition, le SSTT est inactivé via la voie de transduction du signal initiée par la protéine LadS. Comme le PARST est un répresseur du SSTT, nous pensons que ce signal stimule le système GacS/GacA, les petits ARN non codant RsmZ et RsmY, et la protéine RsmA (Valverde *et al.*, 2003). A l'heure actuelle nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse et d'autres études sont nécessaires afin de déterminer les acteurs de la réponse au PARST. L'inactivation des gènes *ladS*, *retS*, *gacS*, *gacA*, *rsmZ*, *rsmY* et *rsmA*, et l'application du PARST sur des cultures de ces mutants pourra permettre d'identifier la voie de transduction de ce signal d'autorépression. D'autre part, l'application du PARST sur une large banque de mutants de transposition aléatoire pourrait également permettre d'identifier des gènes impliqués dans la voie de transduction du signal PARST. Enfin, l'utilisation de puces à ADN pourrait déterminer si le PARST est un régulateur global ou spécifique.

Afin de caractériser le signal PARST, nous avons adopté deux approches : une approche génétique pour déterminer les gènes impliqués dans la biosynthèse de ce signal, et une approche chimique qui consiste à purifier et identifier le PARST par CLHP/MS.

Comme la production du PARST dépend du L-tryptophane (Shen *et al.*, 2008) et les bactéries peuvent produire divers D-amino acides (Lam *et al.*, 2009), nous avons vérifié si le D-tryptophane est impliqué dans la production du PARST. Nous avons confirmé que la production de ce signal dépend du L-tryptophane et non du D-tryptophane. Par la suite, nous avons muté des voies du catabolisme du tryptophane en inactivant les gènes : *kynA*, *kynU*, *pqsA*, *phnAB* et *phzABC1*. L'évaluation de l'activité PARST des surnageants issus de ces différents mutants a montré que la production du PARST dépend faiblement de la voie des kynurénines mais elle ne dépend pas ni de la voie du PQS ni de l'opéron *phnAB*. Cependant, la voie des phénazines pourrait être impliquée dans la production de ce signal. En outre, l'anthranilate pourrait également être impliqué dans cette production via l'indole-3-glycerol-phosphate, précurseur du tryptophane.

Afin de purifier et d'identifier le signal PARST, un protocole a été développé et validé. Dans un premier temps, nous avons montré que ce signal d'autorépression est stable tout au long de ce processus de purification. Par CLHP semi-préparative, nous avons fractionné un surnageant actif et la fraction la plus active a été séparée et analysée par ESI-LC/MS. À 280 nm, nous avons détecté une espèce moléculaire d'une m/z de 224. Cette molécule a été fragmentée par spectrométrie de masse en tandem ESI-LC/MS/MS. Son profil est identique à celui de la phénazine-1-carboxylate. Cette dernière a une masse moléculaire de 224 et, elle est produite par *P. aeruginosa* (Byng *et al.*, 1979; Darby *et al.*, 1999; Denning *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2011). Cette molécule est connue pour avoir une activité antifongique (Thomashow *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2010). Nous avons montré que cette molécule réprime le SSTT uniquement à haute concentration. Cependant, la quantité produite par la bactérie en condition de culture liquide est faible. À 254 nm, deux groupes de molécules possédant une activité PARST ont été détectés. Le premier groupe se compose des masses 136, 338 et 501. Le deuxième contient une masse de 211. Donc, il est possible que le signal PARST soit composé de plusieurs molécules agissant en synergie que nous n'avons pour l'instant que partiellement caractérisées.

D'un point de vue d'une application thérapeutique, ces résultats sont encourageants. L'expression des gènes de virulence est devenue une cible importante pour la découverte de

nouveaux antibiotiques. Une étude a mis en évidence une petite molécule inhibitrice de l'expression des toxines et des pili chez *Vibrio cholerae*. Cette molécule permet la protection des souris contre la colonisation (Hung *et al.*, 2005). La découverte d'une molécule ou d'un ensemble de molécules capable de réprimer totalement l'expression et l'activité du SSTT est d'une importance considérable. Pour ces raisons, il est nécessaire d'accentuer les recherches dans cet axe en vue d'identifier la ou les molécules inhibitrices du SSTT et leurs récepteurs, et de comprendre comment des dérivés du tryptophane sont directement ou indirectement impliqués dans la régulation de ce système. Il faudra donc inactiver d'autres gènes du catabolisme du tryptophane et mesurer l'activité PARST des mutants appropriés (simple et double mutant). Doser l'activité de répression du SSTT de certains métabolites des voies du catabolisme du tryptophane, tels que le 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilate et le 2-amino-4-deoxyisochorismate pourra également donner une réponse. Pour identifier la/les molécules PARST, il est nécessaire d'optimiser chacune des étapes du processus de purification et notamment les extractions liquide-liquide qui doivent être multipliées. Il faudra également optimiser la séparation en mettant en place un gradient d'élution de manière à ajuster la polarité du solvant et affiner la séparation des pics correspondant aux molécules polaires constituant le signal d'autorépression. Par la suite, il faudra essayer d'obtenir par CLHP semi-préparative une quantité suffisante de molécules pour une analyse ultérieure par spectroscopie RMN (1H et 13C). Si les pistes évoquées ci-dessus permettent la caractérisation du PARST, les effets de la/les molécules identifiées sur la modulation de la réponse immune à *P. aeruginosa* pourront être analysés grâce à un modèle disponible au laboratoire permettant l'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire à *P. aeruginosa*. Enfin, l'utilisation à des fins thérapeutiques de ces composés sera évaluée en modèle murin d'infection bronchique. En utilisant des souches rapportrices (contenant une fusion transcritionnelle entre un promoteur du SSTT et la luciférase), il est possible de suivre l'activation du SSTT, mais aussi la diffusion en quelques heures des bactéries. Cette approche permettra l'acquisition des paramètres cinétiques de l'infection en fonction de l'addition ou non du signal d'autorépression. Il faudra également suivre de manière plus classique le taux de mortalité, l'évolution du trouble de perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire, la clairance bactérienne, la translocation bactérienne et le niveau de l'inflammation (TNF circulant).

### Les kynurénines et virulence de *P. aeruginosa*

Une des voies du catabolisme du tryptophane aboutit à la formation des kynurénines. Ces molécules sont produites par l'hôte (Juhás *et al.*, 2005; Zelante *et al.*, 2009) et sont des immunomodulateurs (Belladonna *et al.*, 2009). Dans cette partie, nous avons voulu vérifier d'un côté si les kynurénines produites par la bactérie sont indispensables pour sa virulence, et de l'autre côté, si elles sont des modulateurs de la réponse immune contre la bactérie.

Dans un premier temps, nous avons validé un test colorimétrique de dosage des kynurénines grâce au réactif d'Ehrlich Kovacs. Ce test nous a permis de confirmer la production des kynurénines par *P. aeruginosa* et de mesurer la cinétique. Nous avons montré que la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) codée par le gène *kynA* est l'enzyme clé de la voie de synthèse des kynurénines dans cette bactérie. Une inactivation du gène *kynA* est à l'origine d'une disparition de la production des kynurénine. L'homologue de la TDO chez l'hôte est l'IDO : l'indoléamine 2,3-dioxygénase. Farrow et Pesci (Farrow and Pesci, 2007) ont montré que l'inactivation du gène *kynA* est à l'origine d'une disparition de la production du PQS dont l'anthranilate est le précurseur. Nous avons également remarqué que l'inactivation du gène *kynU* codant une kynuréninase est à l'origine d'une énorme accumulation de kynurénine dans le surnageant bactérien. En cultivant *P. aeruginosa* dans un milieu chimiquement défini en présence ou non du tryptophane, nous avons confirmé que cet acide aminé est indispensable pour produire des kynurénines. Cependant, il semble qu'en cas d'un stress métabolique, la voie des kynurénines n'est pas activée et le tryptophane synthétisé par la bactérie est utilisé pour alimenter d'autres voies métaboliques bien plus importantes. D'autre part, le dosage de kynurénine accumulée par différents mutants, nous a apporté des preuves supplémentaires renforçant l'enchaînement des différentes étapes de biosynthèse et dégradation des kynurénines proposées dans la figure 41. Néanmoins, d'autres études sont encore nécessaires pour bien cerner cette voie notamment en inactivant d'autres gènes et en dosant les métabolites intermédiaires.

En utilisant des fusions transcriptionnelles, nous avons montré que le tryptophane et la kynurénine régulent positivement l'expression du gène *kynA*. Récemment, Knoten et ses collègues (Knoten *et al.*, 2011) ont montré que la kynurénine stimule sa propre synthèse via un nouvel activateur transcriptionnel s'appelant KynR et codé par le gène *kynR*. En utilisant des fusions traductionnelles, Farrow et Pesci ont constaté des phénomènes similaires (Farrow and Pesci, 2007). Nous avons remarqué que la bactérie module la voie métabolique des

kynurénines en fonction de son état de croissance. En effet, l'expression des deux gènes *kynA* et *kynU* est plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance. *In vivo*, ceci pourrait correspondre à l'état d'une infection aiguë. L'expression élevée des deux gènes *kynA* et *kynU* au cours de cette phase a probablement pour but de produire le PQS. En effet, la voie des kynurenines est la source principale de l'anthranilate précurseur du PQS chez *P. aeruginosa* (Farrow and Pesci, 2007; Palmer *et al.*, 2005). Le PQS est impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher and Manoil, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2006). Au cours de la phase stationnaire, l'expression du gène *kynU* diminue rapidement par rapport à l'autre et la bactérie produit plutôt des kynurénines que du PQS. *In vivo*, cette phase pourrait correspondre à un état chronique de l'infection dont la bactérie continue à contourner les défenses immunes de l'hôte afin de pouvoir persister. Il est possible que les kynurénines produites modulent la réponse immunitaire de l'hôte au profit de la bactérie. L'IFN- $\gamma$  stimule l'expression des gènes de la voie des kynurénines chez les eucaryotes (Belladonna *et al.*, 2006; Belladonna *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*, il est possible que l'IFN- $\gamma$  stimule l'expression des gènes de la voie des kynurénines car nous avons remarqué que la quantité de la kynurénine accumulée par le mutant  $\Delta$ *kynU* est plus importante en présence de l'IFN- $\gamma$ . Pour confirmer ceci, il est nécessaire d'étudier l'expression des gènes de la voie en présence de l'IFN- $\gamma$ . D'autre part, nous avons montré qu'au cours du dialogue interrègne bactérie/hôte, la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est stimulée par certains composants du système immunitaire. Le contact de la bactérie avec le sérum humain ou certaines cellules de l'immunité active l'expression du gène *kynA*. Ce contact induit probablement le régulateur transcriptionnel KynR qui active la transcription des gènes de la voie des kynurénines (Knoten *et al.*, 2011).

Dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë, nous avons comparé la virulence de trois souches de *P. aeruginosa* : sauvage, un mutant ne produisant pas de kynurénines et un autre en accumulant une quantité considérable. Nous sommes les premiers à montrer que les kynurénines produites par la bactérie sont importantes pour sa virulence. En effet, l'infection est plus sévère pour les deux souches productrices de kynurénines car elles étaient à l'origine d'une détérioration de la barrière alvéolo-capillaire et une perte de poids de l'hôte plus importante. En outre, la clairance et la dissémination de ces deux souches sont fortes car elles persistent et résistent aux défenses de l'hôte. Ceci pourrait être dû en partie à une modulation par les kynurénines de la réponse immune.

D'autres travaux sont nécessaires afin de comprendre le rôle joué par les kynurénines dans le dialogue interrègne impliquant la bactérie *P. aeruginosa* et son hôte. D'une part pour comprendre comment ces molécules sont impliquées dans la virulence et d'autre part, pour comprendre les mécanismes par lesquels ces molécules modulent la réponse immune.

Divers expériences seront entreprises afin d'étudier d'une façon approfondie les mécanismes de l'interaction hôte/pathogène, *ex vivo*, entre les neutrophiles et *P. aeruginosa*. Pour ce faire, il faudra étudier des fonctions de bactéricidie telles que la phagocytose et la dégranulation. De plus, le comportement migratoire, l'apoptose et la production de cytokines et de chimiokines par les neutrophiles sont des points clés à explorer. Il faudra également chercher l'impact des kynurénines bactériennes sur d'autres cellules soit de l'immunité (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T) soit endothéliales ou épithéliales qui peuvent être à l'origine d'une réponse inflammatoire liée à une agression bactérienne. *In vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire, il est possible d'étudier l'activation de la voie des kynurénines grâce aux souches rapportrices contenant une fusion transcriptionnelle entre les promoteurs des gènes de la voie des kynurénines et la luciférase. Par caméra en luminescence la diffusion des bactéries pourra être suivie ainsi que l'acquisition des paramètres cinétiques de l'infection. Il faudra également étudier l'effet des kynurénines sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Pour la réponse humorale, il est crucial de doser les anticorps dirigés contre la bactérie par ELISA. Pour la réponse cellulaire, il est possible d'utiliser la technique d'ELISpot (Diacclone, France) pour quantifier les lymphocytes T cytotoxiques. En outre, la technique ELISA permettra de doser la production des cytokines et chimiokines. Afin de bloquer la voie des kynurénines et donc la virulence de la bactérie, des analogues du tryptophane comme le 1-méthyl tryptophane (inhibiteur de l'IDO) seront testé sur la TDO. L'inhibition de cette voie représente une cible thérapeutique potentielle.

### **OprF et la virulence de *Pseudomonas aeruginosa***

Cette porine constitue la protéine la plus abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Dans un premier temps, nous avons évalué l'importance de cette porine pour la virulence de *P. aeruginosa* et notamment dans le fonctionnement du SSTT. Nous avons montré que la mutation  $\Delta oprF$  est à l'origine d'une altération de la production mais vraisemblablement pas de la sécrétion des exotoxines. La protéine OprF s'est également révélée importante pour la production d'autres facteurs de virulence tels que : la pyocyanine,



l'élastase, la lectine PA-1L et l'exotoxine A. Elle est aussi nécessaire pour l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte (Fito-Boncompagni *et al.*, 2011). Donc, cette protéine représente une cible thérapeutique importante et c'est la raison pour laquelle nous avons essayé de produire des anticorps anti-OprF.

Par la technique de fusion cellulaire décrite par Köhler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975), nous avons produits des anticorps dirigés contre la protéine OprF et correspondant à l'isotype IgG2b,  $\lambda$ . L'anticorps s'est révélé capable de reconnaître spécifiquement la protéine OprF à des dilutions assez faibles.

Une étude récente (Ding *et al.*, 2010) a montré qu'un sérum anti-OprF inhibait la fixation de l'IFN- $\gamma$  à *P. aeruginosa*. Donc, il est possible qu'un mécanisme alternatif existe, par lequel les anticorps anti-OprF confèrent une protection contre *P. aeruginosa*. Des vecteurs viraux (des adénovirus) exprimant une partie de la protéine OprF ont été testés dans des vaccinations anti-*P. aeruginosa* (Krause *et al.*, 2011; Worgall *et al.*, 2005; Worgall *et al.*, 2007). D'autre part, différents anticorps ont été produits et testés tel que les anticorps : anti-PcrV (Baer *et al.*, 2009) et anti-flagelline A (Barnea *et al.*, 2009) qui augmentent la clearance et diminuent l'invasion de la bactérie respectivement.

Afin de vérifier l'efficacité des anticorps anti-OprF que nous avons produits, des expériences de neutralisation *in vitro* puis *in vivo* seront bientôt initiées.

- *in vitro*, sur des bactéries en culture afin de vérifier l'action de l'anticorps sur l'activité du SSTT ou sur des bactéries en co-culture avec des cellules de l'hôte (macrophages, neutrophiles, cellules épithéliales...etc.) afin de vérifier si la bactérie reste cytotoxique en présence des anticorps.
- *in vivo*, dans un modèle murin d'infection, la mortalité des souris sera évaluée après un challenge infectieux précédé ou accompagné d'injections d'anticorps anti-OprF.

Le SSTT, la voie des kynurénines et la protéine OprF sont impliqués dans la virulence de la bactérie *P. aeruginosa*. Développer des thérapies pour les inactiver est d'une importance capitale. Ces thérapies pourraient être employées simultanément afin de neutraliser la bactérie.

***Références  
Bibliographiques***



## A

- Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. & Schumacher, U. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 2102-2104.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. & Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and Toll-like receptor 2 as well as Toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 1-8.
- Ader, F., Le Berre, R., Lancel, S., Faure, K., Viget, N. B., Nowak, E., Nevière, R. & Guery, B. P. (2007). Inhaled nitric oxide increases endothelial permeability in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Intensive Care Med* 33, 503-510.
- Ader, F., Jawhara, S., Nseir, S., Kipnis, E., Faure, K., Vuotto, F., Chemani, C., Sendid, B., Poulain, D. & Guery, B. (2011). Short term *Candida albicans* colonization reduces *Pseudomonas aeruginosa*-related lung injury and bacterial burden in a murine model. *Crit Care* 15, R150.
- Adler, B., Sasakawa, C., Tobe, T., Makino, S., Komatsu, K. & Yoshikawa, M. (1989). A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 3, 627-635.
- Aebi, C., Bracher, R., Liechti-Gallati, S., Tschappeler, H., Rudeberg, A. & Kraemer, R. (1995). The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis--prognostic significance. *Eur J Pediatr* 154, S69-73.
- Ahn, K. S., Ha, U., Jia, J., Wu, D. & Jin, S. (2004). The *truA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for the expression of type III secretory genes. *Microbiology* 150, 539-547.
- Akbar, S., Schechter, L. M., Lostroh, C. P. & Lee, C. A. (2003). AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 47, 715-728.
- Akeda, Y. & Galan, J. E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437, 911-915.
- Akrim, M., Bally, M., Ball, G., Tommassen, J., Teerink, H., Filloux, A. & Lazdunski, A. (1993). Xcp-mediated protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of two additional genes and evidence for regulation of *xcp* gene expression. *Mol Microbiol* 10, 431-443.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* 66, 3262-3268.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3928-3935.
- Alcorn, J. F. & Wright, J. R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein d by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 279, 30871-30879.
- Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2001). How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* 9, 209-214.
- Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 5, 160-165.
- Alkawash, M. A., Soothill, J. S. & Schiller, N. L. (2006). Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Apmis* 114, 131-138.
- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Lee, D. G., Cornelis, P., Hellewell, P. G. & Whyte, M. K. (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174, 3643-3649.

- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
- Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P. & Pier, G. B. (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68, 3998–4004.
- Alton, E. (2007). Progress and Prospects: Gene therapy clinical trials. *Gene Ther* 14, 1439–1447.
- Amiel, E., Lovewell, R. R., O’Toole, G. A., Hogan, D. A. & Berwin, B. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect Immun* 78, 2937–2945.
- Anderson, D. M., Ramamurthi, K. S., Tam, C. & Schneewind, O. (2002). YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to *yopQ* RNA. *J Bacteriol* 184, 1287–1295.
- Anderson, D. M. & Schneewind, O. (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* 278, 1140–1143.
- Anderson, D. M. & Schneewind, O. (1999). *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol Microbiol* 31, 1139–1148.
- Anderson, G. G., Yahr, T. L., Lovewell, R. R. & O’Toole, G. A. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* magnesium transporter MgtE inhibits transcription of the type III secretion system. *Infect Immun* 78, 1239–1249.
- Arlehamn, C. S. & Evans, T. J. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* pilin activates the inflammasome. *Cell Microbiol* 13, 388–401.
- Asikyan, M. L., Kus, J. V. & Burrows, L. L. (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190, 7022–7034.
- Avidano, M. A., Cotter, C. S., Stringer, S. P. & Schultz, G. S. (1998). Analysis of protease activity in human otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119, 346–351.
- Azghani, A. O. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 132–140.
- Azghani, A. O., Gray, L. D. & Johnson, A. R. (1993). A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect Immun* 61, 2681–2686.
- Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M. & Hancock, R. E. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog* 33, 109–114.
- Azghani, A. O., Miller, E. J. & Peterson, B. T. (2000). Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 178, 261–269.

## B

- Backhed, F., Normark, S., Schweda, E. K., Oscarson, S. & Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for tlr4-mediated lps signalling: A biological role for lps modifications. *Microbes Infect* 5, 1057–1063.
- Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., Fang, F. C. & Miller, S. I. (2003). Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* 50, 219–230.
- Baer, M., Sawa, T., Flynn, P., Luehrsen, K., Martinez, D., Wiener-Kronish, J. P., Yarranton, G. & Bebbington, C. (2009). An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infect Immun* 77, 1083–1090.

- Bahrani, F. K., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1997).** Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun* 65, 4005-4010.
- Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C. A. (1995).** hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* 18, 715-727.
- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. (1996).** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol* 22, 703-714.
- Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J. M., Madoulet, C., Plotkowski, M. C., Chippaux, C. & Puchelle, E. (1994).** Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun* 62, 4481-4487.
- Balfour-Lynn, I. (2007).** Anti Inflammatory approaches to cystic fibrosis airways diseases. *Curr Opin Pulm Med* 13, 522-528.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002).** A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 43, 475-485.
- Ballmann, M., Rabsch, P. & von der Hardt, H. (1998).** Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 53, 732-737.
- Bally, M., Ball, G., Badere, A. & Lazdunski, A. (1991).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the xcpA gene encodes an integral inner membrane protein homologous to *Klebsiella pneumoniae* secretion function protein PulO. *J Bacteriol* 173, 479-486.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A. & Tommassen, J. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol Microbiol* 6, 1121-1131.
- Banerji, S. & Flieger, A. (2004).** Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150, 522-525.
- Barbier, F. & Wolff, M. (2010).** [Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end?]. *Med Sci (Paris)* 26, 960-968.
- Barbieri, J. T. & Sun, J. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 79-92.
- Barker, A. P., Vasil, A. I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P. J. & Vasil, M. L. (2004).** A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 53, 1089-1098.
- Barnea, Y., Carmeli, Y., Neville, L. F., Kahel-Reifer, H., Eren, R., Dagan, S. & Navon-Venezia, S. (2009).** Therapy with anti-flagellin A monoclonal antibody limits *Pseudomonas aeruginosa* invasiveness in a mouse burn wound sepsis model. *Burns* 35, 390-396.
- Bayer, A. S., Speert, D. P., Park, S., Tu, J., Witt, M., Nast, C. C. & Norman, D. C. (1991).** Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 59, 302-308.
- Baysse, C., Cullinane, M., Dénervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., Tam, L., Trevors, J. T. & O'Gara, F. (2005).** Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529-2542.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Sargent, J. L., Levesque, R. C. & Mattick, J. S. (2002).** Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 3605-3613.

- Beaufort, N., Leduc, D., Rousselle, J. C., Namane, A., Chignard, M. & Pidard, D. (2004). Plasmin cleaves the juxtamembrane domain and releases truncated species of the urokinase receptor (CD87) from human bronchial epithelial cells. *FEBS Lett* 574, 89-94.
- Becher, A. & Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* 29, 948-950.
- Beijersbergen, A., Smith, S. J. & Hooykaas, P. J. (1994). Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 32, 212-218.
- Belladonna, M. L., Orabona, C., Grohmann, U. & Puccetti, P. (2009). TGF-beta and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends Mol Med* 15, 41-49.
- Belladonna, M. L., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Schwarcz, R., Fallarino, F. & Puccetti, P. (2006). Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J Immunol* 177, 130-137.
- Beloin, C., McKenna, S. & Dorman, C. J. (2002). Molecular dissection of VirB, a key regulator of the virulence cascade of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 277, 15333-15344.
- Bernardini, M. L., Fontaine, A. & Sansonetti, P. J. (1990). The two-component regulatory system ompR-envZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 172, 6274-6281.
- Bernhards, R. C., Jing, X., Vogelaar, N. J., Robinson, H. & Schubot, F. D. (2009). Structural evidence suggests that antiactivator ExsD from *Pseudomonas aeruginosa* is a DNA binding protein. *Protein Sci* 18, 503-513.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F. O., Ros, A., Lucht, F. & Pozzetto, B. (2005). [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* 53, 341-348.
- Bever, R. A. & Iglewski, B. H. (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J Bacteriol* 170, 4309-4314.
- Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. & Martins dos Santos, V. A. (2008). Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 30, 777-790.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. & Wandersman, C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters. *Gene* 192, 7-11.
- Bionda, C., Li, X. J., van Bruggen, R., Eppink, M., Roos, D., Morel, F. & Stasia, M. J. (2004). Functional analysis of two-amino acid substitutions in gp91 phox in a patient with X-linked flavocytochrome b558-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB-985 cells. *Hum Genet* 115, 418-427.
- Birtalan, S. C., Phillips, R. M. & Ghosh, P. (2002). Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* 9, 971-980.
- Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2006). Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* 188, 3525-3534.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2005). Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 187, 3898-3902.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 300, 534-543.

- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiliaux, V., Parsot, C. & Sansonetti, P. (1999).** The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147, 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. & Allaoui, A. (2001).** Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* 39, 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003).** Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3027-3030.
- Boat, T. F., Welsh, M. J. & Beudet, A. L. (1989).** Cystic fibrosis. In: Scriver, C. R., Beudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (Editors), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 2649-2680.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5, 279-313.
- Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P. & Cornelis, G. R. (1996).** Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J* 15, 5191-5201.
- Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. (2005).** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 57, 1210-1223.
- Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006).** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 43, S49-56.
- Bordi, C., Lamy, M. C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2010).** Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* 76, 1427-1443.
- Borlee, B. R., Goldman, A., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J. & Parsek, M. R. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 75, 827-842.
- Boucher, R. C. (2004).** New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23, 146-158.
- Boyd, J. M., Koga, T. & Lory, S. (1994).** Identification and characterization of PilS, an essential regulator of pilin expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 243, 565-574.
- Boyer, S., Faure, K., Ader, F., Husson, M. O., Kipnis, E., Prangere, T., Leroy, X. & Guery, B. P. (2005).** Chronic pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa* and impaired alveolar fluid clearance. *Respir Res* 6, 17.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13, 20-26.
- Bradley, D. A. (1973).** pilus-dependent *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage with a long noncontractile tail. *Virology* 51, 489-492.
- Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J., Di Serio, C., Döring, G. & Tümmler, B. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 138-145.
- Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P. & Herndon, D. N. (2009).** Emerging Infections in Burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397.
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W. & Tommassen, J. (1998).** Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180, 3467-3469.
- Braun, P., Tommassen, J. & Filloux, A. (1996).** Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 19, 297-306.



- Brencic, A. & Lory, S. (2009).** Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 72, 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L. & Lory, S. (2009).** The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* 73, 434-445.
- Britigan, B. E., Rasmussen, G. T. & Cox, C. D. (1997).** Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect Immun* 65, 1071-1076.
- Broz, P., Mueller, C. A., Muller, S. A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A. & Cornelis, G. R. (2007).** Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* 65, 1311-1320.
- Bruno, M. (2010).** Applications thérapeutiques des protéoliposomes synthétisés in vitro. *Thèse de science, Université Joseph Fourier, Grenoble*, 224 pages.
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A. & Yahr, T. L. (2009).** Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol* 191, 3811-3821.
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A. & Yahr, T. L. (2010).** ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *J Bacteriol* 192, 1479-1486.
- Brutinel, E. D. & Yahr, T. L. (2008).** Control of gene expression by type III secretory activity. *Curr Opin Microbiol* 11, 128-133.
- Budzikiewicz, H. (1993).** Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Rev* 10, 209-228.
- Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxtel, R., Cornelis, G. R., Tommassen, J. & Koster, M. (2004a).** Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 186, 5366-5375.
- Burghout, P., van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S. A., Tommassen, J. & Koster, M. (2004b).** Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 186, 4645-4654.
- Burns, D. L. (1999).** Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* 2, 25-29.
- Burns, J. L., Gibson, R. L., McNamara, S., Yim, D., Emerson, J., Rosenfeld, M., Hiatt, P., McCoy, K., Castile, R., Smith, A. L. & Ramsey, B. W. (2001).** Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 183, 444-52
- Burrowes, E., Abbas, A., O'Neill, A., Adams, C. & O'Gara, F. (2005).** Characterisation of the regulatory RNA RsmB from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* 156, 7-16.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C. & O'Gara, F. (2006).** Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152, 405-418.
- Bustamante, V. H., Santana, F. J. Calva, E. & Puente, J. L. (2001).** Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39, 664-678.
- Byng, G. S., Eustice, D. C. & Jensen, R. A. (1979).** Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 138, 846-852.

## C

- Cabral, D. A., Loh, B. A. & Speert, D. P. (1987).** Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* 22, 429-431.
- Caille, O., Rossier, C. & Perron, K. (2007).** A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 4561-4568.
- Calfee, M. W., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2001).** Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11633-11637.
- Cambronne, E. D., Cheng, L. W. & Schneewind, O. (2000).** LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia* yop virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. *Mol Microbiol* 37, 263-273.
- Cambronne, E. D., Sorg, J. A. & Schneewind, O. (2004).** Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 186, 829-841.
- Campos-Garcia J., Caro, A. D., Najera, R., Miller-Maier, R. M., Al-Tahhan, R. A. & Soberon-Chavez, G. (1998).** The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* 180, 4442-4451.
- Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A. & Lea, S. M. (2003).** Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 278, 17103-17107.
- Carek, P. J., Dickerson, L. M. & Sack, J. L. (2001).** Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 63, 2413-20.
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M. & Samore, M. H. (1999).** Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1379-1382.
- Cascales, E. (2008).** The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* 9, 735-741.
- Cascales, E. & Christie, P. J. (2003).** The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 1, 137-149.
- Castang, S., McManus, H. R., Turner, K. H. & Dove, S. L. (2008).** H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18947-18952.
- Chamngopol, S., Cromie, M. & Groisman, E. A. (2003).** Mg<sup>2+</sup> sensing by the Mg<sup>2+</sup> sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 325, 795-807.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B. P. & Faure, K. (2009).** Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa* induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* 77, 2065-2075.
- Cheng, L. W., Anderson, D. M. & Schneewind, O. (1997).** Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.*;24:757-765.
- Cheng, L. W. & Schneewind, O. (2000).** *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. *J Bacteriol* 182, 3183-3190.
- Chiang, P. & Burrows, L. L. (2003).** Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 2374-2378.
- Chicurel, M. (2000).** Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature* 408, 284-286.
- Chilcott, G. S. & Hughes, K. T. (2000).** Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 694-708.

- Chitnis, C. E. & Ohman, D. E. (1993).** Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol Microbiol* 8, 583-593.
- Choi, K. H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006).** A 10min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64, 391-397.
- Choo, K. H., Tan, T. W., & Ranganathan, S. (2009).** A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC Bioinformatics* 10, (Suppl.15), S2.
- Christie, P. J. (2001).** Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* 40, 294-305.
- Chugani, S. & Greenberg, E. P. (2010).** LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10673-10678.
- Chung, D. R., Song, J. H., Kim, S. H., Thamlikitkul, V., Huang, S. G., Wang, H., So, T. M., Yasin, R. M., Hsueh, P. R., Carlos, C. C., Hsu, L. Y., Buntaran, L., Lalitha, M. K., Kim, M. J., Choi, J. Y., Kim, S. I., Ko, K. S., Kang, C. I. & Peck, K. R. (2011).** High Prevalence of Multidrug-Resistant Non-Fermenters in Hospital-Acquired Pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1409-1417.
- Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A. C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2007).** Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 17, 957-991.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2004).** The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1, 6194-6199.
- Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J. & López-Boado, Y. S. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: Implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol* 173, 5659-5670.
- Coburn, J. & Gill, D. M. (1991).** ADP-ribosylation of p21ras and related proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 59, 4259-4262.
- Coburn, B., Sekirov, I. & Finlay, B. B. (2007).** Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20, 535-549.
- Coburn, J., Kane, A. V., Feig, L. & Gill, D. M. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* 266, 6438-6446.
- Coburn, J., Wyatt, R. T., Iglewski, B. H. & Gill, D. M. (1989).** Several GTP-binding proteins, including p21c-H-ras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Biol Chem* 264, 9004-9008.
- Cohen, J. D., Slovin, J. P. & Hendrickson, A. M. (2003).** Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8, 197-199.
- Collins, F. S. (1992).** Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774-779.
- Cometta, A., Baumgartner, J. D., Lew, D., Zimmerli, W., Pittet, D., Chopart, P., Schaad, U., Herter, C., Eggimann, P., Huber, O., Ricou, B., Suter, P., Auckenthaler, R., Chiolerio, R., Bille, J., Scheidegger, C., Frei, R. & Glauser, M. P. (1994).** Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 1309-1313.
- Comolli, J. C., Hauser, A. R., Waite, L., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S. & Engel, J. N. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity invitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 67, 3625-3630.

- Coraux, C., Kileztky, C., Polette, M., Hinnrasky, J., Zahm, J. M., Devillier, P., De Bentzmann, S. & Puchelle, E. (2004). Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 605–612.
- Corech, R., Rao, A., Laxova, A., Moss, J., Rock, M. J., Li, Z., Kosorok, M. R., Splaingard, M. L., Farrell, P. M. & Barbieri, J. T. (2005). Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43, 3956–3962.
- Cornelis, G., Vanootegem, J. C. & Sluiter, C. (1987). Transcription of the *yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 2, 367–379.
- Cornelis, G. R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop ‘type III’ weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 742–752.
- Cornelis, G. R. (2003). How Yops find their way out of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 50, 1091–1094.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811–825.
- Cornelis, G. R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M. P., Vanooteghem, J. C. & Michiels, T. (1991). *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol* 5, 1023–1034.
- Cornelis, G. R. & Wolf-Watz, H. (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 23, 861–867.
- Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304, 242–248.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176, 2137–2142.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2003). Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol Microbiol* 49, 529–539.
- Cowell, B. A., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 250, 71–76.
- Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2, 363–378.
- Craig, L., Volkman, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H. & Tainer, J. A. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* 23, 651–662.
- Crozier, K. R. & Moran, G. R. (2007). Heterologous expression and purification of kynurenine-3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* strain 17400. *Protein Expr Purif* 51, 324–333.
- Crozier-Reabe, K. R., Phillips, R. S. & Moran, G. R. (2008). Kynurenine 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens*: substrate-like inhibitors both stimulate flavin reduction and stabilize the flavin-peroxy intermediate yet result in the production of hydrogen peroxide. *Biochemistry* 47, 12420–12433.
- Cryz, S. J. Jr., Pitt, T. L., Furer, E. & Germanier, R. (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 44, 508–513.
- Cuzick, A., Stirling, F. R., Lindsay, S. L. & Evans, T. J. (2006). The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infect Immun* 74, 4104–4113.

## D

- D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. & Manoil, C. (2001).** *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183, 1466-1471.
- d'Enfert, C., Ryter, A. & Pugsley, A. P. (1987).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J* 6, 3531-3538.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. & Toussaint, B. (1999).** Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* 67, 6164-6167.
- Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., Polack, B. & Toussaint, B. (2002).** Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon. *Infect Immun* 70, 3973-3977.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. & Attree, I. (2001).** Pore-forming activity of type III system secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa* infected macrophages. *Mol Microbiol* 40, 76-85.
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J. & Attree, I. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 68, 2916-2924.
- Dahan, S., Knutton, S., Shaw, R. K., Crepin, V. F., Dougan, G. & Frankel, G. (2004).** Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect Immun* 72, 5452-5459.
- Dalrymple, B. & Mattick, J. S. (1987).** An analysis of the organization and evolution of type 4 fimbrial (MePhe) subunit proteins. *J Mol Evol* 25, 261-269.
- Dame, R. T., Luijsterburg, M. S., Krin, E., Bertin, P. N., Wagner, R. & Wuite, G. J. (2005).** DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* 187: 1845-1848.
- Darby, C., Cosma, C. L., Thomas, J. H. & Manoil, C. (1999).** Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15202-15207.
- Darwin, K. H. & Miller, V. L. (1999).** InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181, 4949-4954.
- Darwin, K. H. & Miller, V. L. (2001).** Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J* 20, 1850-1862.
- Darzins, A. & Russell, M. A. (1997).** Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system. *Gene* 192, 109-115
- Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G. W. & Yahr, T. L. (2006).** Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca<sup>2+</sup> and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* 74, 3334-3341.
- Dasgupta, N., Lykken, G. L., Wolfgang, M. C. & Yahr, T. L. (2004).** A novel anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 53, 297-308.
- Dautin, N. & Bernstein, H. D. (2007).** Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61, 89-112.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.

- Davies, J. C. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* 3, 128–134.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027-1036.
- Day, W. A. Jr. & Maurelli, A. T. (2001).** *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates *virB* expression but is not essential for virulence. *Infect Immun* 69, 15-23.
- Dean, P. (2011).** Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* 35, 1100-1125.
- Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S. & Lea, S. M. (2010).** Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* 67, 1065-1075.
- Deane, J. E., Roversi, P., Cordes, F. S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W. D., Picking, W. L., Blocker, A. J. & Lea, S. M. (2006).** Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12529-12533.
- de Bentzmann, S., Polette, M., Zahm, J. M., Hinrasky, J., Kileztky, C., Bajolet, O., Klossek, J. M., Filloux, A., Lazdunski, A. & Puchelle, E. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab Invest* 80, 209-219.
- de Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. (2000).** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849.
- Dekimpe, V. & Déziel, E. (2009).** Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates Las R-specific factors. *Microbiology* 155, 712–723.
- Delepelaire, P. (2004).** Type I secretion in Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694, 149–161.
- Denning, G. M., Iyer, S. S., Reszka, K. J., O'Malley, Y., Rasmussen, G. T. & Britigan, B. E. (2003).** Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L584-592.
- Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L. & Britigan, B. E. (1998).** *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* 66, 5777–5784.
- Derouazi, M., Toussaint, B., Quénée, L., Epaulard, O., Guillaume, M., Marlu, R. & Polack, B. (2008).** High-yield production of secreted active proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Appl Environ Microbiol.* 74, 3601–3604.
- Derouazi, M., Wang, Y., Marlu, R., Epaulard, O., Mayol, J. F., Pasqual, N., Le Gouellec, A., Polack, B. & Toussaint, B. (2010).** Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: Application to TRP-2. *Bioeng Bugs* 1, 51-60.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R. & Henderson, I. R. (2009).** Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* 17, 139–145.
- Desvaux, M., Parham, N. J. & Henderson, I. R. (2004).** Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* 6, 111-124.
- Déziel, E., Comeau, Y. & Villemur, R. (2001).** Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183, 1195–1204.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lepine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. & Rahme, L.G. (2005).** The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and

- quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55, 998–1014.
- Déziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. & Villemur, R. (1999).** Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* 1440, 244–252.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1339–1344.
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003).** RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–2013.
- Diaz, M. R., King, J. M. & Yahr, T. L. (2011).** Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front Microbiol* 2, 89.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. & Winzer, K. (2006).** The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8, 1095–1104.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P., (2003).** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50, 29–43.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Cámara, M. (2002).** Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184, 2576–2586.
- Ding, B., von Specht, B. U. & Li, Y. (2010).** OprF/I-vaccinated sera inhibit binding of human interferon-gamma to *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 28, 4119–4122.
- Ding, Z., Atmakuri, K. & Christie, P. J. (2003).** The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol* 11, 527–535.
- Dodge, J. A., Lewis, P. A., Stanton, M. & Wilsher, J. (2007).** Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003. *Eur Respir J* 29, 522–526.
- Doig, P., Smith, N. R., Todd, T. & Irvin, R. T. (1987).** Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells. *Infect Immun* 55, 1517–1522.
- Dorman, C. J. (2007).** H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5, 157–161.
- Dorman, C. J., McKenna, S. & Beloin, C. (2001).** Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int J Med Microbiol* 291, 89–96.
- Drake, D. & Montie, T. C. (1988).** Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 134, 43–52.
- Dubern, J. F., Lugtenberg, B. J. & Bloemberg, G. V. (2006).** The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J Bacteriol* 188, 2898–2906.
- Dubnau, D. (1999).** DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53, 217–244.
- Dubnau, D. & Losick, R. (2006).** Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* 61, 564–572.

- Dubois, V., Arpin, C., Melon, M., Melon, B., Andre, C., Frigo, C. & Quentin, C. (2001).** Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol* 39, 2072-2078.
- Dulon, S., Cande, C., Bunnett, N. W., Hollenberg, M. D., Chignard, M. & Pidard, D. (2003).** Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 339-346.
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M. & Filloux, A. (2001).** The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147-153.
- Duong, F., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1996).** Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Mol Microbiol* 21, 459-470.
- Durand, J. M. & Björk, G. R. (2009).** Metabolic control through ornithine and uracil of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. *Microbiology* 155, 2498-2508
- Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E & Björk, G. R. (2000).** Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol Microbiol* 35, 924-935.

## E

- Economou A. (1999).** Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 7, 315-320.
- Egan, S. M. (2002).** Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J Bacteriol* 184, 5529-5532.
- Eichelberg, K. & Galan, J. E. (1999).** Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infect Immun* 67, 4099-4105.
- Elborn, J. S., Shale, D. J. & Britton, J. R. (1991).** Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* 46, 881-885.
- Ellermeier, C. D. & Slauch, J. M. (2003).** RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 185, 5096-5108.
- Elsen, S., Ragno, M. & Attree, I. (2011).** PtrA is a periplasmic protein involved in Cu tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193, 3376-3378.
- Enderle, P. J. & Farwell, M. A. (1998).** Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25, 954-956.
- Engel, J. & Balachandran, P. (2009).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12, 61-66.
- Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C. & O'Callaghan, R. J. (1998a).** Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 273, 16792-16797.
- Engel, L. S., Hill, J. M., Moreau, J. M., Green, L. C., Hobden, J. A. & O'Callaghan R. J. (1998b).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 662-665.
- Engel, L. S., Hobden, J. A., Moreau, J. M., Callegan, M. C., Hill, J. M. & O'Callaghan, R. J. (1997).** *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1535-1542.



- Epaulard, O., Derouazi, M., Margerit, C., Marlu, R., Filopon, D., Polack, B. & Toussaint, B. (2008).** Optimization of a type III secretion system-based *Pseudomonas aeruginosa* live vector for antigen delivery. *Clin Vaccine Immunol* 15, 308-313.
- Epaulard, O., Toussaint, B., Quénée, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., Marche, P. N. & Polack, B. (2006).** Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol Ther* 14, 656-661.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. (2003).** Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47, 103-118.
- Ernst, R. K., Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Moskowitz, S. M., Wilson, C. B. & Miller, S. I. (2003).** *Pseudomonas aeruginosa* lipid a diversity and its recognition by tolllike receptor 4. *J Endotoxin Res* 9, 395-400.
- Ernst, R. K., Moskowitz, S. M., Emerson, J. C., Kraig, G. M., Adams, K. N., Harvey, M. D., Ramsey, B., Speert, D. P., Burns, J. L. & Miller, S. I. (2007).** Unique lipid a modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 196, 1088-1092.
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M. & Miller, S. I. (1999).** Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286, 1561-1565.
- Estrellas, P. S. Jr., Alionte, L. G. & Hobden, J. A. (2000).** A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr Eye Res* 20, 157-165.
- Evans, L. R. & Linker, A. (1973).** Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 116, 915-924.

## F

- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. & Gualerzi, C. O. (1998).** Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* 17, 7033-7043.
- Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M., Ellert, N. W., Sherburne, R., Irvin, R. T., Sherburne, R. & Paranchych, W. (1994).** Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. *Infect Immun* 62, 4118-4123.
- Farrow, J. M. 3rd. & Pesci, E. C. (2007).** Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* 189, 3425-3433.
- Faucher, S. P., Porwollik, S., Dozois, C. M., McClelland, M. & Daigle, F. (2006).** Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1906-1911.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. & Attree, I. (2006).** Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45, 8117-8123.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. & Prince, A. (1998).** Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66, 43-51.
- Feldman, M. F. & Cornelis, G. R. (2003).** The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* 219, 151-158.

- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. & Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147, 2659-2669.
- Ferracci, F., Day, J. B., Ezelle, H. J. & Plano, G. V. (2004). Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in *Yersinia pestis* is the result of a +1 translational frameshift event. *J Bacteriol* 186, 5160-5166.
- Ferracci, F., Schubot, F. D., Waugh, D. S. & Plano, G. V. (2005). Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Mol Microbiol* 57, 970-987.
- Filloux, A. (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* 1694, 163-179.
- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. & Lazdunski, A. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J* 9, 4323-4329.
- Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., Wretling, B. & Lazdunski, A. (1989). Cloning of *Xcp* genes located at the 55-min region of the chromosome and involved in protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 3, 261-265.
- Filloux, A., Bleves, S., vanUlsen, P. & Tommassen, J. (2003). Protein secretion mechanisms in *Pseudomonas*. In: Ramos, J.-L. (Ed.), *Pseudomonas*, vol. I. Genomics, Life Style and Molecular Architecture. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York : 749-792.
- Filloux, A., Hachani, A. & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154, 1570-1583.
- Filloux, A. & Hardie, K. R. (1998). A systematic approach to the study of protein secretion in Gram-negative bacteria. *Methods Microbiol* 27, 301-318.
- Filloux, A., Murgier, M., Wretling, B. & Lazdunski, A. (1987). Characterization of 2 *Pseudomonas aeruginosa* mutants with defective secretion of extracellular proteins and comparison with other mutants. *FEMS Microbiol Lett* 40, 159-163.
- Filloux, A. & Vallet, I. (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci* 19, 77-83.
- Filloux, A. & Ventre, I. (2006). [Two sensors to control bacterial life style: the choice between chronic or acute infection]. *Med Sci (Paris)* 22, 811-814.
- Filopon, D. (2005). Mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*: système de sécrétion de type III, épigénèse et quorum sensing. *Thèse de science, Université Joseph Fourier, Grenoble*, 188 pages.
- Filopon, D., Merieau, A., Bernot, G., Comet, J. P., Leberre, R., Guery, B., Polack, B. & Guespin-Michel, J. (2006). Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P. aeruginosa*. *BMC Bioinformatics* 7, 272.
- Finnen, R. L., Martin, N. L., Siehnel, R. J., Woodruff, W. A., Rosok, M. & Hancock, R. E. (1992). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF by use of truncated OprF derivatives and monoclonal antibodies. *J Bacteriol* 174, 4977-4985.
- Fish, D. N., Piscitelli, S. C. & Danziger, L. H. (1995). Development of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patient characteristics in 173 studies. *Pharmacotherapy* 15, 279-291.
- Fito-Boncompagni, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Véron, W., Taupin, L., Toussaint, B., Cornelis, P., Wei, Q., Shioya, K., Déziel, E., Feuilloley, M. G., Orange, N., Dufour, A. & Chevalier, S. (2011). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* 79, 1176-1186.

- Fletcher, M. P., Diggle, S. P., Cámara, M. & Williams, P. (2007).** Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nat Protoc* 2, 1254-1262.
- Floret, D. (2009).** [Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France]. *Ann Pharm Fr* 67, 219-223.
- Folders, J., Tommassen, J., van Loon, L. C. & Bitter W. (2000).** Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 1257-1263.
- Forsberg, A., Viitanen, A. M., Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. (1991).** The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 5, 977-986.
- Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. (1988).** The virulence protein Yop5 of *Yersinia pseudotuberculosis* is regulated at transcriptional level by plasmid-pIB1-encoded trans-acting elements controlled by temperature and calcium. *Mol Microbiol* 2, 121-133.
- Francis, M. S., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. (2002).** Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 5, 166-172.
- Frank, D. W. (1997).** The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 26, 621-629.
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186, 4457-4465.
- Fraylick, J. E., La Rocque, J. R., Vincent, T. S. & Olson, J. C. (2001).** Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect Immun* 69, 5318-5328.
- Fraylick, J. E., Riese, M. J., Vincent, T. S., Barbieri, J. T. & Olson, J. C. (2002a).** ADP-ribosylation and functional effects of *Pseudomonas* exoenzyme S on cellular RalA. *Biochemistry* 41, 9680-9687.
- Fraylick, J. E., Rucks, E. A., Greene, D. M., Vincent, T. S. & Olson, J. C. (2002b).** Eukaryotic cell determination of ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 91-100.
- Fu, H., Coburn, J. & Collier, R. J. (1993).** The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2320-2324.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010).** The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* 192, 3553-3564.
- Fujita, K., Akino, T. & Yoshioka, H. (1988).** Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 56, 1385-1387.

## G

- Gacesa, P. (1998).** Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects. *Microbiology* 144, 1133-1143.
- Galan, J. E. & Collmer, A. (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.
- Galan, J. E. & Wolf-Watz, H. (2006).** Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444, 567-573.
- Gallagher, L. A. & Manoil, C. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* 183, 6207-6214.

- Gallegos, M. T., Williams, P. A. & Ramos, J. L. (1997).** Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53. *J Bacteriol* 179, 5024-5029.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173, 3000-3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993).** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 61, 1180-1184.
- Ganesan, A. K., Frank, D. W., Misra, R. P., Schmidt, G. & Barbieri, J. T. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* 273, 7332-7337.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J. C. & Van Immerseel, F. (2006).** Butyrate specifically down-regulates *salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 72, 946-949.
- García Véscovi, E., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. (1996).** Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84, 165-174.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T., Sargent, J., Fang, X., Cordwell, S., Matthay, M. A. & Engel, J. N. (2004).** The ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT contributes to its biological activities. *Infect Immun* 72, 546-558.
- Gébus, C., Faudry, E., Bohn, Y. S., Elsen, S. & Attree, I. (2008).** Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* 283, 23940-23949.
- Gerlach, R.G. & Hensel, M. (2007).** Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297, 401-415.
- Germ, M., Yoshihara, E., Yoneyama, H. & Nakae, T. (1999).** Interplay between the efflux pump and the outer membrane permeability barrier in fluorescent dye accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 452-455.
- Giamarellou, H. (2002).** Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother* 49, 229-233.
- Gibson, J., Sood, A. & Hogan, D. A. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*-*Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Appl Environ Microbiol* 75, 504-513.
- Gilboa-Garber, N. (1982).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods Enzymol* 83, 378-385.
- Gilgenkrantz, S. (2005).** [Small treatise on art of warfare... from Shigella]. *Med Sci (Paris)* 21, 443-444.
- Gilleland, H. E. Jr., Hughes, E. E., Gilleland, L. B., Matthews-Greer, J. M. & Staczek, J. (1995).** Use of synthetic peptides to identify surface-exposed, linear B-cell epitopes within outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* 31, 279-286.
- Gilligan, P. H. (1991).** Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4, 35-51.
- Giraud, C., Bernard, C. S., Calderon, V., Yang, L., Filloux, A., Molin, S., Fichant, G., Bordi, C. & de Bentzmann, S. (2011).** The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environ Microbiol* 13, 666-683.
- Glick, J. & Garber, N. (1983).** The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol* 129, 3085-3090.

- Gloyne, L. S., Grant, G. D., Perkins, A. V., Powell, K. L., McDermott, C. M., Johnson, P. V., Anderson, G. J., Kiefel, M. & Anoopkumar-Dukie, S. (2011). Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 25, 1353-1358.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. & Barbieri, J. T. (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274, 36369-36372.
- Goguen, J. D., Yother, J. & Straley, S. C. (1984). Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* mu d1(Ap lac) insertion mutants. *J Bacteriol* 160, 842-848.
- Gomez-Duarte, O. G. & Kaper, J. B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 1767-1776.
- Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 33, 279-294.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S. & Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* 7, 745-754.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A. & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 23, 249-259.
- Gophna, U., Ron, E. Z. & Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312, 151-163.
- Goranson, J., Hovey, A. K. & Frank, D. W. (1997). Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:1646-1654.
- Goss, J. W., Sorg, J. A., Ramamurthi, K. S., Ton-That, H. & Schneewind, O. (2004). The secretion signal of YopN, a regulatory protein of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *J Bacteriol* 186, 6320-6324.
- Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T. & Nishino, T. (1989). Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J Bacteriol* 171, 983-990.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R. & Attree, I. (2005). Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* 192, 218-225.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. & Attree, I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* 72, 4741-4750.
- Govan, J. R. & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60, 539-574.
- Govan, J. R. & Fyfe, J. A. (1978). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid from to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. *J Antimicrob Chemother* 4, 233-240.
- Granstrom, M., Ericsson, A., Strandvik, B., Wretling, B., Pavlovskis, O. R., Berka, R. & Vasil, M. L. (1984). Relation between antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand* 73, 772-777.
- Gray, G. L., Smith, D. H., Baldrige, J. S., Harkins, R. N., Vasil, M. L., Chen, E. Y. & Heyneker, H. L. (1984). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2645-2649.

- Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. K. & Vitanza-jack, V. B. (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28, 987-991.
- Greenberg, E. P. (2000).** Bacterial genomics. Pump up the versatility. *Nature* 406, 947-948.
- Groisman, E. A. (2001).** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183, 1835-1842.
- Guespin-Michel, J. E., Polack, B. & Mérieau, A. (2003).** Bacterial adaptation and epigenesis. *Recent Res Devel Microbiology* 7, 289-305.
- Guespin-Michel, J. F., Bernot, G., Comet, J. P., Merieau, A., Richard, A., Hulen, C. & Polack, B. (2004).** Epigenesis and dynamic similarity in two regulatory networks in *pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biotheor* 52, 379-390.
- Gupta, S. K., Berk, R. S., Masinick, S. & Hazlett, L. D. (1994).** Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 62, 4572-4579.
- Guttman, D. S. & Greenberg, J. T. (2001).** Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *Mol Plant-Microb Interact* 14, 145-155.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173, 5290-5297.

## H

- Ha, U. & Jin, S. (2001).** Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells. *Infect Immun* 69, 4398-4406.
- Ha, U. H., Kim, J., Badrane, H., Jia, J., Baker, H. V., Wu, D. & Jin, S. (2004).** An *in vivo* inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system. *Mol Microbiol* 54, 307-320.
- Ha, U. H., Wang, Y. & Jin, S. (2003).** DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect Immun* 71, 1590-1595.
- Hachani, A., Lossi, N. S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jove, D. & Filloux, A. (2011).** Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of Vgr G proteins. *J Biol Chem* 286, 12317-12327.
- Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Tsai, J. H., Wilson, C. B. & Miller, S. I. (2002).** Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific lps modifications. *Nat Immunol* 3, 354-359.
- Hakansson, S., Galyov, E. E., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (1996).** The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* 20, 593-603.
- Haller, J. C., Carlson, S., Pederson, K. J. & Pierson, D. E. (2000).** A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol* 36, 1436-1446.
- Hamood, A. N., Colmer, J. A. Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (1996).** Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene, *ptxR*, which positively regulates exotoxin A production. *Mol Microbiol* 21, 97-110.
- Hancock, R. E. W., Decad, G. M. & Nikaido, H. (1979).** Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Biochim Biophys Acta* 554, 323-331.
- Hancock, R. E. W. & Nikaido, H. (1978).** Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J Bacteriol* 136, 381-390.

- Harris, A. D., Perencevich, E., Roghmann, M. C., Morris, G., Kaye, K. S. & Johnson, J. A. (2002). Risk factors for piperacillin–tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 854–858.
- Hassan, H. M. & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol* 141, 156–163.
- Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S. V., Rowe, J. J., Yoon, S. S., Hilliard, G. M., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Wozniak, D. J., Hwang, S. H., McDermott, T. R. & Ochsner, U. A. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1425–1443.
- Hastie, A. T., Hingley, S. T., Higgins, M. L., Kueppers, F. & Shryock, T. (1986). Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* inactivates mammalian tracheal ciliary axonemes. *Cell Motil Cytoskeleton* 6, 502–509.
- Hatch, R. A. & Schiller, N. L. (1998). Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 974–977.
- Hauser, A. R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Valles, J., Engel, J. N. & Rello, J. (2002). Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 30, 521–528.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7, 654–665.
- Hauser, A. R. & Ozer, E. A. (2011). [*Pseudomonas aeruginosa*]. *Nat Rev Microbiol* 9, 3.
- Hauser, G. & Karnovsky, M. L. (1957). Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 224, 91–105.
- Heeb, S. & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 1351–1363.
- Heeb, S., Kuehne, S. A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M. D., Haas, D., Camara, M. & Williams, P. (2006). Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* 355, 1026–1036.
- Heck, L. W., Alarcon, P. G., Kulhavy, R. M., Morihara, K., Russell, M. W. & Mestecky, J. F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* 144, 2253–2257.
- Hendrixson, D. R., de la Morena, M. L., Stathopoulos, C. & St Geme, 3rd, J. W. (1997). Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol* 26, 505–518.
- Henrichsen, J. (1983). Twitching motility. *Ann Rev Microbiol* 37, 81–93.
- Henriksson, M. L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H. & Hallberg, B. (2000). Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited in vivo by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem J* 347, 217–222.
- Henriksson, M. L., Sundin, C., Jansson, A. L., Forsberg, A., Palmer, R. H. & Hallberg, B. (2002). Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem J* 367, 617–628.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 183, 5395–5401.

- Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1990).** Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* 9, 1769-1776.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P. & Haas, D. (2004).** Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186, 2936–2945.
- Hirayama, T. & Kato, I. (1984).** Mode of cytotoxic action of pseudomonal leukocidin on phosphatidylinositol metabolism and activation of lysosomal enzyme in rabbit leukocytes. *Infect Immun* 43, 21-27.
- Hirche, T. O., Benabid, R., Deslee, G., Gangloff, S., Achilefu, S., Guenounou, M., Lebargy, F., Hancock, R. E. & Belaouaj, A. (2008).** Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 181, 4945-4954.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998).** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77-86.
- Hobbs, M., Collie, E. S., Free, P. D., Livingston, S. P. & Mattick, J. S. (1993).** PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 7, 669-682.
- Hodak, H. & Jacob-Dubuisson, F. (2007).** Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol* 158, 631–637.
- Hodgkinson, J. L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P. C., Morris, E. P., Wall, J. S., Lea, S. M. & Blocker, A. J. (2009).** Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol* 16, 477–485.
- Hogardt, M. & Heesemann, J. (2010).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300, 557-562.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L. & Heesemann, J. (2004).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 150, 843-851.
- Hoiby, N. (1977).** *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 262, 1–96.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. (2010).** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322-332.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. & Bjarnsholt, T. (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3, 55-65.
- Holland, I. B., Schmitt, L. & Young, J. (2005).** Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol* 22, 29–39.
- Holloway, B. W., Römling, U. & Tümmler, B. (1994).** Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology* 140, 2907-2929.
- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., Benz, R., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. (2001).** LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 39, 620–632.



- Homma, J. Y., Matsuura, M., Shibata, M., Kazuyama, Y., Yamamoto, M., Kubota, Y., Hirayama, T. & Kato, I. (1984).** Production of leukocidin by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and antileukocidin antibody from sera of patients with diffuse panbronchiolitis. *J Clin Microbiol* 20, 855-859.
- Hong, Y. Q. & Ghebrehiwet, B. (1992).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* 62:133-138.
- Honko, A. N. & Mizel, S. B. (2004).** Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun* 72, 6676-6679.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., Silverman, J. M., Ohlson, B. B., Hicks, K. G., Plemel, R. L., Li, M., Schwarz, S., Wang, W. Y., Merz, A. J., Goodlett, D. R. & Mougous, J. D. (2010).** A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25–37.
- Hornef, M. W., Roggenkamp, A. Geiger, A. M., Hogardt, M., Jacobi, C. A. & Heesemann, J. (2000).** Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microbial pathogenesis* 29, 329-343.
- Horvat, R. T. & Parmely, M. J. (1988).** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun* 56, 2925-2932.
- Hovey, A. K. & Frank, D. W. (1995).** Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* 177, 4427-4436.
- Hueck, C. J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 379-433.
- Hung, D. T., Shakhnovich, E. A., Pierson, E. & Mekalanos, J. J. (2005).** Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670-674.
- Hussain, A. S., Bozinovski, J., Maurice, D. H., McLaughlin, B. E., Marks, G. S., Brien, J. F. & Nakatsu, K. (1997).** Inhibition of the action of nitric oxide prodrugs by pyocyanin: mechanistic studies. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 398-406.

## I

- Ibarra, J. A., Perez-Rueda, E., Segovia, L. & Puente, J. L. (2008).** The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica* 133, 65-76.
- Ichikawa, J. K., English, S. B., Wolfgang, M. C., Jackson, R., Butte, A. J. & Lory, S. (2005).** Genome-wide analysis of host responses to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system yields synergistic effects. *Cell Microbiol* 7, 1635–1646.
- Iglewski, B. H. & Kabat, D. (1975).** NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2284-2288.
- Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J. & Maxwell, E. S. (1978).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3211-3215.
- Imberty, A., Wimmerova, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-Garber, N. (2004).** Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan recognition. *Microb Infect* 6, 222–229.
- Inclan, Y. F., Huseby, M. J. & Engel, J. N. (2011).** FimL regulates cAMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6, e15867.

- Iriarte, M., Sory, M. P., Boland, A., Boyd, A. P., Mills, S. D., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. (1998).** TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* 17, 1907-1918.
- Ishimoto, K. S. & Lory, S. (1989).** Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1954-1957.
- Ishimoto, K. S. & Lory, S. (1992).** Identification of *pilR*, which encodes a transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin gene. *J Bacteriol* 174, 3514-3521.
- Izoré, T., Job, V. & Dessen, A. (2011).** Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* 19, 603-612.

## J

- Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2004).** Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 4466-4475.
- Jacob-Dubuisson, F., Loch, C. & Antoine, R. (2001).** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* 40, 306-313.
- Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S., Cullina, J., Potter, E., Powers, C., Prickett, M., Seshadri, R., Jovanovic, B., Petrocheilou, A., King, J. D. & Hauser, A. R. (2008).** Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Transl Res* 152, 257-264.
- Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J. F., Powers, C. A., Schulert, G. S., BarMeir, M., Sullivan, C. L., McColley, S. A. & Hauser, A. R. (2004).** Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 42, 5229-5237.
- Jarrell, K. F. & McBride, M. J. (2008).** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6, 466-476.
- Jensen, P.O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M. & Høiby, N. (2007).** Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153, 1329-1338.
- Jin, Y., Yang, H., Qiao, M. & Jin, S. (2011).** MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193, 399-410.
- Johanson, Jr. W. G., Higuchi, J. H., Chaudhuri, T. R. & Woods, D. E. (1980).** Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 121, 55-63.
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. & Sandkvist, M. (2006).** Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 255, 175-186.
- Jones, A. K., Fulcher, N. B., Balzer, G. J., Urbanowski, M. L., Pritchett, C. L., Schurr, M. J., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010).** Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through *mucA* mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *J Bacteriol* 192, 5709-5717.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. & Cornelis, G. R. (2003).** The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302, 1757-1760.
- Juhas, M., Eberl, L. & Tümmler, B. (2005).** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 7, 459-471.

## K

- Kaiser, D. (2007).** Bacterial swarming: a re-examination of cell movement patterns. *Curr Biol* 17, R561-R570.

- Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T. & Sasakawa, C. (2000).** SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 38, 805-816.
- Kang, Y., Nguyen, D. T., Son, M. S. & Hoang, T. T. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 beta-oxidation. *Operon Microbiology* 154, 1584-1598.
- Kang, Y., Lunin, V. V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M. J. & Hoang, T. T. (2009).** The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 73, 120-136.
- Kaniga, K., Bossio, J. C. & Galan, J. E. (1994).** The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol Microbiol* 13, 555-568.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. & Haas, D. (2006).** Two GacA dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 6026-6033.
- Kendall, M. M., Rasko, D. A. & Sperandio, V. (2007).** Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75, 4875-4884.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M. & Finlay, B. B. (1997).** Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 65, 2606-2612.
- Kersten, R. D. & Dorrestein, P. C. (2009).** Secondary metabolomics: natural products mass spectrometry goes global. *ACS Chem Biol* 4, 599-601.
- Kessler, E. & Safrin, M. (1988).** Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol* 170, 5241-5247.
- Kessler, E. & Safrin, M. (1994).** The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts as an elastase inhibitor. *J Biol Chem* 269, 22726-22731.
- Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R., Rosenbloom, J. & Ohman, D. E. (1997).** Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* 272, 9884-9889.
- Kim, J., Ahn, K., Min, S., Jia, J., Ha, U., Wu, D. & Jin, S. (2005).** Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 151, 3575-3587.
- Kipnis, E., Guery, B. P., Tournoy, A., Leroyt, X., Robrique, L., Fialdes, P., Nevriere, R. & Fourrier, F. (2004).** Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock* 21, 444-451.
- Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006).** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36, 78-91.
- Kirkeby, S., Wimmerova, M., Moe, D. & Hansen, A. K. (2007).** The mink as an animal model for *Pseudomonas aeruginosa* adhesion: binding of the bacterial lectins (PA-IL and PA-IIL) to neoglycoproteins and to sections of pancreas and lung tissues from healthy mink. *Microbes Infect* 9, 566-573.
- Kirschnek, S. & Gulbins, E. (2006).** Phospholipase A2 functions in *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis. *Infect Immun* 74, 850-60.
- Knight, D. A., Finck-Barbancon, V., Kulich, S. M. & Barbieri, J. T. (1995).** Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 63, 3182-3186.
- Knoten, C. A., Hudson, L. L., Coleman, J. P., Farrow, J. M. 3rd. & Pesci, E. C. (2011).** KynR, a Lrp/AsnC-type transcriptional regulator, directly controls the kynurenine pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193, 6567-6575.

- Köhler, G. & Milstein, C. (1975).** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C. & Pechere, J. C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990-5996.
- Kojic, M., Aguilar, C. & Venturi, V. (2002).** TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J Bacteriol* 184, 2324-2330.
- Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F. & Venturi, V. (2005).** Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 246, 175-181.
- Kojic, M. & Venturi, V. (2001).** Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J Bacteriol* 183, 3712-3720.
- Kollef, K. E., Schramm, G. E., Wills, A. R., Reichley, R. M., Micek, S. T. & Kollef, M. H. (2008).** Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Chest* 134, 281-287.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M. & Gejyo, F. (1999).** The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25, 313-321.
- Konig, B., Vasil, M. L. & Konig, W. (1997).** Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase c from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human granulocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 112, 115-124.
- Kopp, E. & Medzhitov, R. (2003).** Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 396-401.
- Koronakis, V., Koronakis, E. & Hughes, C. (1989).** Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J* 8, 595-605.
- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G. & Stathopoulos, C. (2005).** Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* 187, 4306-4314.
- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R. & Tommassen, J. (1997).** The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 26, 789-797.
- Kownatzki, R., Tummler, B. & Doring, G. (1987).** Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1, 1026-1027.
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K. & Barbieri, J. T. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun* 68, 6066-6068.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K. J. & Barbieri, J. T. (2002).** *In vivo* rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun* 70, 360-367.
- Krause, A., Whu, W. Z., Xu, Y., Joh, J., Crystal, R. G. & Worgall, S. (2011).** Protective anti-*Pseudomonas aeruginosa* humoral and cellular mucosal immunity by AdC7-mediated expression of the *P. aeruginosa* protein OprF. *Vaccine* 29, 2131-2139.
- Krieg, D. P., Bass, J. A. & Mattingly, S. J. (1988).** Phosphorylcholine stimulates capsule formation of phosphate-limited mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 56, 864-873.
- Kuang, Z., Hao, Y., Hwang, S., Zhang, S., Kim, E., Akinbi, H. T., Schurr, M. J., Irvin, R. T., Hassett, D. J. & Lau, G. W. (2011).** The *Pseudomonas aeruginosa* flagellum confers resistance to pulmonary surfactant protein-A by impacting the production of exoproteases through quorum-sensing. *Mol Microbiol* 79, 1220-1235.

- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S. I. (1998).** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280, 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. (2000).** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10225-10230.
- Kuchma, S. L., Connolly, J. P. & O'Toole, G. A. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 1441-1454.
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W. & Lory, S. (2006).** Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 4037-4050.
- Kurnasov, O., Goral, V., Colabroy, K., Gerdes, S., Anantha, S., Osterman, A. & Begley, T. P. (2003a).** NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* 10,1195-1204.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T. & Osterman, A. (2003b).** Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett* 227, 219-227.

## L

- Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., de Pedro, M. A. & Waldor, M. K. (2009).** D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325, 1552-1555.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7072-7077.
- Laskowski, M. A. & Kazmierczak, B. I. (2006).** Mutational analysis of RetS, an unusual sensor kinase-response regulator hybrid required for *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Infect Immun* 74, 4462-4473.
- Laskowski, M. A., Osborn, E. & Kazmierczak, B. I. (2004).** A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 54, 1090-1103.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21, 1137-1146.
- Lau, G. W., Hassett, D. J. & Britigan, B. E. (2005).** Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 13, 389-397.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. (2004).** The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10, 599-606.
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. & Mavrodi, D. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 72, 4275-4278.
- Laughlin, R. S., Musch, M. W., Hollbrook, C. J., Rocha, F. M., Chang, E. B. & Alverdy, J. C. (2000).** The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg* 232, 133-142.
- Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M. & Altier, C. (2003).** Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 48, 1633-1645.

- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2002).** Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 46, 1451-1464.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M. & Murgier, M. (1990).** Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 72, 147-156.
- Le Gall, T., Mavris, M., Martino, M. C., Bernardini, M. L., Denamur, E. & Parsot, C. (2005).** Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *Microbiology* 151, 951-962.
- Learn, D. B., Brestel, E. P. & Seetharama, S. (1987).** Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect Immun* 55, 1813-1818.
- Lee, C. A. (1997).** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* 5, 148-156.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2006).** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90.
- Lee, T. W., Brownlee, K. G., Conway, S. P., Denton, M. & Littlewood, J. M. (2003).** Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2, 29-34.
- Lee, V. T., Mazmanian, S. K. & Schneewind, O. (2001).** A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol* 183, 4970-4978.
- Lee, V. T., Smith, R. S., Tummler, B. & Lory, S. (2005).** Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 73, 1695-1705.
- Leidal, K. G., Munson, K. L. & Denning, G. M. (2001).** Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on il-8 and rantes expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 186-195.
- Leidal, K. G., Munson, K. L., Johnson, M. C. & Denning, G. M. (2003).** Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J Interferon Cytokine Res* 23, 307-318.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzi, S., Burley, S. K., Almo, S. C. & Mekalanos, J. J. (2009).** Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4154-4159.
- Lepine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J. & Rahme, L. G. (2004).** Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Soc Mass Spec* 15, 862-869.
- Lesser, C. F. & Leong, J. M. (2011).** Bacterial scaffolds assemble novel higher-order complexes to reengineer eukaryotic cell processes. *Sci Signal* 4, pe32.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R. & Rahme, L. G. (2009).** Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155, 2845-2855.
- Liang, H., Duan, J., Sibley, C. D., Surette, M. G. & Duan, K. (2011).** Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 60, 22-34.
- Lilic, M., Vujanac, M. & Stebbins, C. E. (2006).** A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell* 21, 653-664.

- Linares, J. F., Lopez, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F. & Martinez, J. L. (2005).** Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 1384-1391.
- Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2003).** The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal* 15, 1081-1089.
- Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009).** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22, 582-610.
- Liu, S., Yahr, T. L., Frank, D. W. & Barbieri, J. T. (1997).** Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 1609-1613.
- Llosa, M. & O'Callaghan, D. (2004).** Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: bacterial gates into the outer world. *Mol Microbiol* 53, 1-8.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (2001).** *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* 39, 520– 531.
- Lloyd, S. A., Sjostrom, M., Andersson, S. & Wolf-Watz, H. (2002).** Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol* 43, 51–59.
- Lolans, K., Queenan, A. M., Bush, K., Sahud, A. & Quinn, J. P. (2005).** First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3538-3540.
- López-Boado, Y. S., Wilson, C. L. & Parks, W. C. (2001).** Regulation of matrilysin expression in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Biol Chem* 276, 41417-41423.
- Lory, S. (1986).** Effect of iron on accumulation of exotoxin A-specific mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 168, 1451-1456.
- Lory, S., Merighi, M. & Hyodo, M. (2009).** Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 51-52.
- Lory, S., Wolfgang, M., Lee, V. & Smith, R. (2004).** The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int J Med Microbiol* 293, 479-482.
- Lostroh, C. P. & Lee, C. A. (2001).** The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P(prgH) from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 183, 4876-4885.
- Lovell, R. R., Collins, R. M., Acker, J. L., O'Toole, G. A., Wargo, M. J. & Berwin, B. (2011).** Step-wise loss of bacterial flagellar torsion confers progressive phagocytic evasion. *PLoS Pathog* 7, e1002253.
- Lu, J., Huang, X., Li, K., Li, S., Zhang, M., Wang, Y., Jiang, H. & Xu, Y. (2009).** LysR family transcriptional regulator PqsR as repressor of pyoluteorin biosynthesis and activator of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas sp.* M18. *J Biotechnol* 143, 1-9.
- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C. & Yu, J. (2005).** Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* 73, 88-102.
- Lutz, F. (1979).** Purification of a cytotoxic protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon* 17, 467-475.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000).** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2, 1051-1060.

- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.
- Lykken, G. L., Chen, G., Brutinel, E. D., Chen, L. & Yahr, T. L. (2006). Characterization of ExsC and ExsD self-association and heterocomplex formation. *J Bacteriol* 188, 6832-6840.
- Lynn, W. A. & Golenbock, D. T. (1992). Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 13, 271-276.

## M

- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K. & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 5, e1000354.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier, M. H. Jr. (2003). Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* 1611, 223-233.
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G. A. & Jouenne, T. (2008). Identification of biofilm-associated cluster (*bac*) in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation and virulence. *PLoS One* 3, e3897.
- Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57, 77-100.
- Maeda, K., Kobayashi, Y., Oie, S., Ishida, S., Okano, Y., Kobayashi, T., Shikichi, K., Mizuno, H. & Kamiya, A. (2008). Antimicrobial effects of drugs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Pharm Bull* 31, 1898-1901.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.
- Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J. & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease iv degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L409-L418.
- Manillier, J. (2007). Production et identification du PARST (*Pseudomonas* Auto repressor of secretion three) . *Mémoire (Master), Université de Bretagne Sud, Lorient*, 30 pages.
- Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N. & Lomovskaya, O. (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol Microbiol* 46, 889-901.
- Morales, D. K., Jacobs, N. J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J. R. & Hogan, D. A. (2010). Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol* 78, 1379-1392.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M. & Galan, J. E. (2006). Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* 441, 637-640.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan A., Thomas, D. R., Galan, J. E. & Unger, V. M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306, 1040-1042.
- Martin, R. G. & Rosner, J. L. (2001). The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* 4, 132-137.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8377-8381.
- Marx, C. J. & Lidstrom, M. E. (2002). Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* 33, 1062-1067.



- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I., Jensen, P., Johnsen, A. H., Givskov, M., Ohman, D. E., Molin, S., Høiby, N. & Kharazmi, A. (1999).** Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: A mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145, 1349–1357.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E. & Lory S. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3100-3105.
- Matson, J. S. & Nilles, M. L. (2001).** LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 183, 5082-5091.
- Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004).** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186, 4449-4456.
- Matsumoto K. (2004).** Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* 385, 1007-1016.
- Matthijs, S., Baysse, C., Koedam, N., Tehrani, K. A., Verheyden, L., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Hoorelbeke, B., Meyer, J. M., De Greve, H. & Cornelis, P. (2004).** The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. *Mol Microbiol* 52, 371–384.
- Mattick, J. S. (2002).** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56, 289-314.
- Maurelli, A. T., Blackmon, B. & Curtiss, R. 3rd. (1984).** Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. *Infect Immun* 43, 195-201.
- Mavris, M., Page, A. L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P. & Parsot, C. (2002).** Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol* 43, 1543-1553.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. & Thomashow, L. S. (2001).** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183, 6454-6465.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2007).** New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* 15, 508–515.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. & Pierson, L. S. 3rd. (1992).** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *pseudomonads* in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58, 2616-2624.
- McCarter, L. L. (2006).** Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol* 9, 180-186.
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K. & Yahr, T. L. (2002).** ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* 46, 1123-1133.
- McGuffie, E. M., Frank, D. W., Vincent, T. S. & Olson, J. C. (1998).** Modification of Ras in eukaryotic cells by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 66, 2607-2613.
- McIver, K. S., Kessler, E. & Ohman, D. E. (2004).** Identification of residues in the *Pseudomonas aeruginosa* elastase propeptide required for chaperone and secretion activities. *Microbiology* 150, 3969–3977.
- McIver, K. S., Kessler, E., Olson, J. C. & Ohman, D. E. (1995).** The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 18, 877–889.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000).** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 2702–2708.

- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D. & Wainwright, B. (2003). Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun* 71, 6035-6044.
- Medina, G., Juarez, K., Diaz, R. & Soberon-Chavez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149, 3073-3081.
- Medina, G., Juarez, K. & Soberon-Chavez, G. (2003b). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* 185, 377-380.
- Mehta, A. (2005). CFTR: More than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol* 39, 292-298.
- Mellies, J. L., Barron, A. M., Haack, K. R., Korson, A. S. & Oldridge, D. A. (2006). The global regulator Ler is necessary for enteropathogenic *Escherichia coli* colonization of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* 74, 64-72.
- Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L. & Oliver, A. (2008). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* 190, 7910-7917.
- Ménard, R., Sansonetti, P. & Parsot, C. (1994). The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 13, 5293-5302.
- Merrell, D. S. & Falkow, S. (2004). Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 430, 250-256.
- Mettetal, J. T. & van Oudenaarden, A. (2007). Microbiology. Necessary noise. *Science* 317, 463-464.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 518-523.
- Michel, G. P., Durand, E. & Filloux, A. (2007). XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 3776-3783.
- Michiels, T. & Cornelis, G. R. (1991). Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J Bacteriol* 173, 1677-1685.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M. & Cornelis, G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun* 58, 2840-2849.
- Micek, S. T., Welch, E. C., Khan, J., Pervez, M., Doherty, J. A., Reichley, R. M., Hoppe-Bauer, J. Dunne, W. M. & Kollef, M. H. (2011). Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med* 6, 405-410.
- Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C. & Filloux, A. (2009). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *CupD* fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* 4, e6018.
- Miller, V. L. (2002). Connections between transcriptional regulation and type III secretion? *Curr Opin Microbiol* 5, 211-215.
- Minamino, T. & Namba, K. (2004). Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7, 5-17.
- Minamino, T., Shimada, M., Okabe, M., Saijo-Hamano, Y., Imada, K., Kihara, M. & Namba, K. (2010). Role of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA in bacterial flagellar type III protein export. *J Bacteriol* 192, 1929-1936.
- Mitobe, J., Arakawa, E. & Watanabe, H. (2005). A sensor of the two-component system CpxA affects expression of the type III secretion system through posttranscriptional processing of InvE. *J Bacteriol* 187, 107-113.

- Miyazaki, S., Matsumoto, T., Tateda, K., Ohno, A. & Yamaguchi, K. (1995). Role of exotoxin in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol* 43, 169–175.
- Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotech* 14, 255–261.
- Morales, D. K., Jacobs, N. J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J. R. & Hogan, D. A. (2010). Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol* 78, 1379–1392.
- Moriyama, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H. & Ebata, M. (1965). *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Isolation, crystallization, and preliminary characterization. *J Biol Chem* 240, 3295–3304.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. & Sasakawa C. (2006). *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* 281, 599–607.
- Mota, L. J. (2006). Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol* 14, 197–200.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. & Mekalanos, J. J. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526–1530.
- Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Rossier, O., Bonas, U. & Staskawicz, B. J. (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13324–13329.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. & Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000213.
- Mulcahy, H., O'Callaghan, J., O'Grady, E. P., Adams, C. & O'Gara, F. (2006). The posttranscriptional regulator RsmA plays a role in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and human airway epithelial cells by positively regulating the type III secretion system. *Infect Immun* 74, 3012–3015.
- Muller, M. (2011). Glutathione modulates the toxicity of, but is not a biologically relevant reductant for, the *Pseudomonas aeruginosa* redox toxin pyocyanin. *Free Radic Biol Med*. 50, 971–977.
- Murray, T. S., Egan, M. & Kazmierczak, B. I. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr* 19, 83–88

## N

- Nadler, C., Shifrin, Y., Nov, S., Kobi, S. & Rosenshine, I. (2006). Characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* mutants that fail to disrupt host cell spreading and attachment to substratum. *Infect Immun* 74, 839–849.
- Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mizuta, Y. & Kohno, S. (2008). The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis* 61, 375–378.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201.
- Nestorovich, E. M., Sugawara, E., Nikaido, H. & Bezrukov, S. M. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J Biol Chem* 281, 16230–16237.
- Neyt, C. & Cornelis, G. R. (1999). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* 31, 143–156.

- Nguyen, D. & Singh, P. K. (2006).** Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8305-8306.
- Nicastro, G. G., Boechat, A. L., Abe, C. M., Kaihama, G. H. & Baldini, R. L. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiol Lett* 301, 115–123.
- Nicas, T. I., Frank, D. W., Stenzel, P., Lile, J. D. & Iglewski, B. H. (1985).** Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Clin Microbiol* 4, 175-179.
- Nishiya, H., Kunii, O. & Noda, M. (1993).** Priming effect of pseudomonal leukocidin on chemiluminescence response of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol Immunol* 37, 531-536.
- Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J. & Franklin, M. J. (2001).** Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 183, 1047-1057.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M. & Goldman, A. (2004).** The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallelbeta-roll. *EMBOJ* 23, 701–711.
- Nunn, D. N. & Lory, S. (1991).** Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene *pilD* is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3281–3285.

O

- O'Callaghan, J., Reen, F. J., Adams, C. & O'Gara, F. (2011).** Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs *rsmZ* and *rsmY*. *Microbiology* 157, 3417-3428.
- O'Callaghan, R. J., Engel, L. S., Hobden, J. A., Callegan, M. C., Green, L. C. & Hill, J. M. (1996).** *Pseudomonas* keratitis. The role of an uncharacterized exoprotein, protease IV, in corneal virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 534-543.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M. & Britigan, B. E. (2003).** The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1077–L1086.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M. & Britigan, B. E. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L94–L103.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- Observatoire National de la mucoviscidose. Paris. (2006).** Bilan des données 2004. *Vaincre la mucoviscidose et INED*.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176, 2044-2054.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6424-6428.
- Okuda, K., Morihara, K., Atsumi, Y., Takeuchi, H., Kawamoto, S., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Fukushima, J. (1990).** Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *Infect Immun* 58, 4083-4088.
- Oliver, A. M. & Weir, D. M. (1985).** The effect of *Pseudomonas* alginate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin Exp Immunol* 59, 190-196.

- Olson, J. C. & Ohman, D. E. (1992).** Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J Bacteriol* 174, 4140-4147.
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. & Gros, P. (2004).** Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBOJ* 23, 1257-1266.
- Orabona, C., Puccetti, P., Vacca, C., Bicciato, S., Luchini, A., Fallarino, F., Bianchi, R., Velardi, E., Perruccio, K., Velardi, A., Bronte, V., Fioretti, M. C. & Grohmann, U. (2006).** Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107, 2846-2854
- Orenstein, D. M., Winnie, G. B. & Altman, H. (2002).** Cystic fibrosis: a 2002 update. *J Pediatr* 140, 156-164.
- Ostroff, R. M. & Vasil, M. L. (1987).** Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 169, 4597-4601.
- Ostroff, R. M., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1990).** Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 172, 5915-5923.
- Ottow, J. C. G. (1975).** Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* 29, 79-108.

**P**

- Page, A. L. & Parsot, C. (2002).** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* 46, 1-11.
- Pallen, M. J., Beatson, S. A. & Bailey, C. M. (2005).** Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* 29, 201-229.
- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K. & Whiteley, M. (2005).** Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol* 187, 5267-5277.
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K. & Tolker-Nielsen, T. (2008).** Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68, 223-240.
- Papanikou, E., Karamanou, S. & Economou, A. (2007).** Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 5, 839-851.
- Paranchych, W. & Frost, L. S. (1988).** The physiology and biochemistry of pili. *Adv Microb Physiol* 29, 53-114.
- Paranchych, W., Pasloske, B. L. & Sastry, P.A. (1990).** Expression, processing, and assembly of *Pseudomonas aeruginosa* N-methylphen-ylalanine pilin. In: Silver, S., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B. and Kaplan, S. (Eds.), *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 343-351.
- Park, S. & Galloway, D. R. (1995).** Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 16, 263-270.
- Park, S. & Galloway, D. R. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* LasD processes the inactive LasA precursor to the active protease form. *Arch Biochem Biophys* 357, 8-12.
- Park, P. W., Pier, G. B., Hinkes, M. T. & Bernfield, M. (2001).** Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411, 98-102.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R. & Zhou, W. W. (1990).** Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 58, 3009-3014.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. & Demers, B. (2005).** A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the

- control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 56, 1627-1635.
- Parsot, C., Hamiaux, C. & Page, A. L. (2003).** The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6, 7-14.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J. & Attree, I. (2005).** PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* 253, 95-101.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68, 3795-3801.
- Pavlovskis, O. R., Iglewski B. H. & Pollack, M. (1978).** Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a in experimental mouse infections: Adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun* 19, 29-33.
- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F. & Koch, C. (1992).** Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47, 6-13.
- Pederson, K. J., Vallis, A. J., Aktories, K., Frank, D. W. & Barbieri, J. T. (1999).** The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol* 32, 393-401.
- Pegues, D. A., Hantman, M. J., Behlau, I. & Miller, S. I. (1995).** PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* 17, 169-181.
- Perentesis, J. P., Miller, S. P. & Bodley, J. W. (1992).** Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors* 3, 173-184.
- Perry, J. D., Laine, L., Hughes, S., Nicholson, A., Galloway, A. & Gould, F. K. (2008).** Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. *J Antimicrob Chemother* 61, 1057-1061.
- Persson, C., Nordfelth, R., Holmstrom, A., Hakansson, S., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (1995).** Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* 18, 135-150.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999).** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11229-11234.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001).** The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 6676-6683.
- Petterson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. & Wolf-Watz, H. (1996).** Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* 273, 1231-1233.
- Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A. & Ghosh, P. (2003).** In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 278, 41326-41332.
- Phillips, R. S. (2011).** Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase. *Biochim Biophys Acta* 1814, 1481-1488.
- Pielage, J. F., Powell, K. R., Kalman, D. & Engel, J. N. (2008).** RNAi screen reveals an Abl kinase-dependent host cell pathway involved in *Pseudomonas aeruginosa* internalization. *PLoS Pathog* 4, e1000031.

- Pier, G. B. (1985).** Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J Infect Dis* 151, 575–580.
- Pier, G. B. (2000).** Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8822–8828.
- Pier, G. B. (2002).** CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol* 5, 81–86.
- Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. & Ohman, D. E. (2001).** Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 69, 1895–1901.
- Pier, G. B., Grout, M. & Zaidi, T. S. (1997).** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12088–12093.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R. & Goldberg, J. B. (1996).** Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271, 64–67.
- Goldberg, J. B. & Pier, G. B. (1996).** *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol* 4, 490–494.
- Pierre, M., Husson, M. O., Le Berre, R., Desseyn, J. L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Cardinaud, B., Barbry, P., Gottrand, F. & Guery, B. P. (2007).** Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1422–L1431.
- Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J. L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Gottrand, F. & Husson, M. O. (2008).** [Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model]. *Med Mal Infect* 38, 318–323.
- Platt, M. D., Schurr, M. J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., Levesque, R. C., Fedynak, A., Brinkman, F. S., Schurr, J., Hwang, S. H., Lau, G. W., Limbach, P. A., Rowe, J. J., Lieberman, M. A., Barraud, N., Webb, J., Kjelleberg, S., Hunt, D. F. & Hassett, D. J. (2008).** Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. *J Bacteriol* 190, 2739–2758.
- Plé, S., Job, V., Dessen, A. & Attree, I. (2010).** Co-chaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192, 3801–3808.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., & Meyer, T. F. (1987).** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458–462.
- Pollack, C., Straley, S. C. & Klemperer, M. S. (1986).** Probing the phagolysosomal environment of human macrophages with a Ca<sup>2+</sup>-responsive operon fusion in *Yersinia pestis*. *Nature* 322, 834–836.
- Porter, M. E., Mitchell, P., Roe, A. J., Free, A., Smith, D. G. & Gally, D. L. (2004).** Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54, 1117–1133.
- Poyraz, O., Schmidt, H., Seidel, K., Delissen, F., Ader, C., Tenenboim, H., Goosmann, C., Laube, B., Thünemann, A. F., Zychlinsky, A., Baldus, M., Lange, A., Griesinger, C. & Kolbe, M. (2010).** Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nat Struct Mol Biol* 17, 788–792.

Pressler, T., Bohmova, C., Conway, S., Dumcius, S., Hjelte, L., Høiby, N., Kollberg, H., Tümmler, B. & Vavrova, V. (2011). Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros* 10, S75-78.

Price, B. M., Barten Legutki, J., Galloway, D. R., von Specht, B. U., Gilleland, L. B., Gilleland, H. E. Jr. & Staczek, J. (2002). Enhancement of the protective efficacy of an *oprF* DNA vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33, 89–99.

Proesmans, M., Balinska-Miskiewicz, W., Dupont, L., Bossuyt, X., Verhaegen, J., Høiby, N. & de Boeck, K. (2006). Evaluating the “Leeds criteria” for *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis centre. *Eur Respir J* 27, 937–943.

Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Manos, J., Belas, R., Falkow, S. & Gunn, J. S. (2004). Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41, 177-185.

Prunier, A. L., Schuch, R., Fernández, R. E, Mummy, K. L., Kohler, H., McCormick, B. A. & Maurelli, A. T. (2007). *nadA* and *nadB* of *Shigella flexneri* 5a are antivirulence loci responsible for the synthesis of quinolinate, a small molecule inhibitor of *Shigella* pathogenicity. *Microbiology* 153, 2363-2372.

Pukatzki, S., Kessin, R. H. & Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3159-3164.

Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15508-15513.

Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1528–1533.

## Q

Quénéée, L., Lamotte, D. & Polack, B. (2005). Combined *sacB*-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* 38, 63-67.

Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A. & Attree, I. (2005). The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280, 36293-36300.

Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J. P., Attree, I. & Dessen, A. (2007). Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7803-7808.

Quinn, J. P., Dudek, E. J., DiVincenzo, C. A., Lucks, D. A. & Lerner, S. A. (1986). Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 154, 289–294.

## R

Rabin, S. D., Veessenmeyer, J. L., Biegging, K. T. & Hauser, A. R. (2006). A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect Immun* 74, 2552-2561.

Radke, J., Pederson, K. J. & Barbieri, J. T. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a biglutamic acid ADP-ribosyltransferase. *Infect Immun* 67, 1508-1510.



- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 899-1902.
- Rahme, L. G., Tan, M. W., Le, L., Wong, S. M., Tompkins, R. G., Calderwood, S. B. & Ausubel, F. M. (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13245–13250.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. & Soberon-Chavez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnopyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40, 708-718.
- Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. (2003). Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol Microbiol* 50, 1189– 1198.
- Ramamurthi, K. S & Schneewind, O. (2002). *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. *J Bacteriol* 184, 3321-3328.
- Ramos, J. L. (ed.) (2004). *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Ramos, H. C., Rumbo, M. & Sirard, J. C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12, 509-517.
- Raser, J. M. & O'Shea, E. K. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* 309, 2010-2013.
- Ratjen, F. & Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-689.
- Rawling, E. G., Brinkman, F. S. & Hancock, R. E. (1998). Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J Bacteriol* 180, 3556–3562.
- Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A. & Cantiello, H. F. (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *Journal of Biological Chemistry* 269, 20584-20591.
- Rello, J. & Diaz, E. (2003). Pneumonia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 31, 2544–2551.
- Rietsch, A. & Mekalanos, J. J. (2006). Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 59, 807-820.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L. & Mekalanos, J. J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8006-8011.
- Rietsch, A., Wolfgang, M. C. & Mekalanos, J. J. (2004). Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 72, 1383-1390.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C. COLLINS, F. S. & Tsui, L. C. (1989). Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073.
- Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A. & Olson, J. C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun* 71, 5296-5305.
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. & Lam, J. S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 523-553.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V. & Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8, 498-504.
- Rodriguez-Martinez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4783-4788.

- Rohde, J. R., Fox, J. M. & Minnich, S. A. (1994). Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 12, 187-199.
- Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. (1999). The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* 181, 4198-4204.
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J. R., Tsui, L. C. & Collins, F. S. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. & Finlay, B. B. (1996). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun* 64, 966-973.
- Rosenthal, V. D., Udwardia, F. E., Muñoz, H. J., Erben, N., Higuera, F., Abidi, K., Medeiros, E. A., Fernández Maldonado, E., Kanj, S. S., Gikas, A., Barnett, A. G. & Graves, N.; the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). (2011). Time-dependent analysis of extra length of stay and mortality due to ventilator-associated pneumonia in intensive-care units of ten limited-resources countries: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Epidemiol Infect* 15, 1-7.
- Rosqvist, R., Magnusson, K. E. & Wolf-Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 13, 964-972.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. & Bonas, U. (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9368-9373.
- Roy, D., Liston, D. R., Idone, V. J., Di, A., Nelson, D. J., Pujol, C., Bliska, J. B., Chakrabarti, S. & Andrews, N. W. (2004). A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science* 304, 1515-1518.
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y. & Paulsen, I. T. (2010). Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* 5, e8842.
- Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. & Wiener-Kronish, J. P. (2001). Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 183, 1767-1774.
- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A. & de Bentzmann, S. (2008). The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J* 27, 2669-2680.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect* 2, 1721-1731.
- Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10, 644-648.

## S

- Sabuda, D. M., Laupland, K., Pitout, J., Dalton, B., Rabin, H., Louie, T. & Conly, J. (2008). Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 19, 413-418.
- Sage, A. E. & Vasil, M. L. (1997). Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 179, 4874-4881.

- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R. & Bleves, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel typeV secretion system. *Environ Microbiol* 12, 1498–1512.
- Salcher, O. & Lingens, F. (1980). Metabolism of tryptophan by *Pseudomonas aureofaciens* and its relationship to pyrrolnitrin biosynthesis. *J Gen Microbiol* 121, 465-471.
- Saliba, A. M., Nascimento, D. O., Silva, M. C., Assis, M. C., Gayer, C. R., Raymond, B., Coelho, M. G., Marques, E. A., Touqui, L., Albano, R. M., Lopes, U. G., Paiva, D. D., Bozza, P. T. & Plotkowski, M. C. (2005). Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell Microbiol* 7, 1811-1822.
- Salyers, A. & Witt, D. (1994). Virulence factors that damage the host In: Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Salyers, A. and Witt, D., Eds, 47–62. ASM Press, Washington, DC.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type: Serial (Book, Monograph).
- Sargent, F. (2007). The twin-arginine transport system: moving folded Proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* 35, 835–847.
- Sato, H., Feix, J. B. & Frank, D. W. (2006). Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry* 45, 10368-10375.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R. M., Wiener-Kronish, J. & Sawa, T. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* 22, 2959–2969.
- Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D. W. (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* 25, 547-557.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184, 1140–1154.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickström, D., de Gier, J. W., Van der Schors, R. C., Smit, A. B., Jong, W. S. & Luirink, J. (2009). The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155, 3982–3991.
- Sayner, S. L., Frank, D. W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J. & Stevens, T. (2004). Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 95, 196–203.
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 53, 841-853.
- Scharmman, W. (1976a). Formation and isolation of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 93, 283-291.
- Scharmman, W. (1976b). Purification and characterization of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 93, 292-302.
- Scharmman, W. (1976c). Cytotoxic effects of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on polymorphonuclear leukocytes from cattle. *InfectImm* 13, 836-843.
- Schechter, L. M., Damrauer, S. M. & Lee, C. A. (1999). Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 32, 629-642.

- Schmid, A., Neumayer, W., Trulzsch, K., Israel, L., Imhof, A., Roessle, M., Sauer, G., Richter, S., Lauw, S., Eylert, E., Eisenreich, W., Heesemann, J. & Wilharm G. (2009). Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J Biol Chem* 284, 12165-12177.
- Schraiddt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J. E. & Marlovits, T. C.(2010). Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* 6, e1000824.
- Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E. & Pier, G. B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6907-6912.
- Schultz, M. J., Rijneveld, A. W., Florquin, S., Speelman, P., van Deventer, S. J. & van der Poll, T. (2001). Impairment of host defence by exotoxin a in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *J Med Microbiol* 50, 822–827.
- Schultz, M. J., Speelman, P., Zaat, S. A., Hack, C. E., van Deventer, S. J. & van der Poll, T. (2000). The effect of *Pseudomonas* exotoxin a on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 227–232.
- Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C. & Deretic, V. (1993). The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell Mol Biol Res* 39, 371-376.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185, 2066–2079.
- Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R. & Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81, 1063-1073.
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B. & Luirink, J. (2000). YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J* 19, 542-549.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. & Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheathlike structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11638–11643.
- Seok, Y., Bae, I. K., Jeong, S. H., Kim, S. H., Lee, H. & Lee, K. (2011). Dissemination of IMP-6 metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea. *J Antimicrob Chemother* 66, 2791-2796.
- Shafikhani, S. H. & Engel, J. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15605-15610.
- Shafikhani, S. H., Morales, C. & Engel, J. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 10, 994–1007.
- Shankar, S., Ye, R. W., Schlichtman, D. & Chakrabarty, A. M. (1995). Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70, 221-255.
- Shaver, C. M. & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72, 6969–6977.

- Shen, D. K. (2006).** Régulation du Système de Sécrétion de Type III de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de science, Université Joseph Fourier, Grenoble, 183 pages.
- Shen, D. K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B. & Toussaint, B. (2008).** High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology* 154, 2195-2208.
- Shen, D. K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B. & Toussaint, B. (2006).** PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74, 1121-1129.
- Shere, K. D., Sallustio, S., Manassis, A., D'Aversa, T. G. & Goldberg, M. B. (1997).** Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerate sactin-based motility. *Mol Microbiol* 25, 451-462.
- Sheth, H. B., Lee, K. K., Wong, W. Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R. S., Paranchych, W. & Irvin, R. T. (1994).** The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol Microbiol* 11, 715-723.
- Shin, S., Castanie-Cornet, M. P., Foster, J. W., Crawford, J. A., Brinkley, C. & Kaper, J. B. (2001).** An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* 41, 1133-1150.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784-790.
- Singh, G., Wu, B., Baek, M. S., Camargo, A., Nguyen, A., Slusher, N. A., Srinivasan, R., Wiener-Kronish, J. P. & Lynch, S. V. (2010).** Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxins is dependent on pseudomonas quinolone signal concentration. *Microb Pathog* 49, 196-203.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000).** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407, 762-764.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K. E. & Musser, J. M. (2007).** Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol* 15, 63-69.
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R. & Olson, M. V. (2006).** Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8487-8492.
- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003).** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6, 56-60.
- Smith, R. S., Wolfgang, M. C. & Lory, S. (2004).** An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 72, 1677-1684.
- Sonnleitner, E. & Haas, D. (2011).** Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 63-79.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M. & Prince, A. S. (2008).** The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J Bacteriol* 190, 2814-2821.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. (1995).** Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11998-12002.

- Sory, M. P. & Cornelis, G. R. (1994). Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* 14, 583-594.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A. & Bleves, S. (2007). Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 3124–3132.
- Sostarich, A. M., Zollmann, D., Haefner, H., Luetticken, R., Schulze-Roebecke, R. & Lemmen, S. W. (2008). Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. *Infection* 36, 31–35.
- Sperandio, V., Li, C. C. & Kaper, J. B. (2002). Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* 70, 3085-3093.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S. & Kaper, J. B. (1999). Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15196-15201.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8951-8956.
- Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B., Baker, D., Miller, S. I. & Strynadka, N. C. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 16, 468–476.
- Stainier, I., Iriarte, M. & Cornelis, G. R. (1997). YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of *yop* transcription. *Mol Microbiol* 26, 833-843.
- Stapper, A. P., Narasimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Hoiby, N. & Mathee, K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* 53, 679-690.
- Steiner, T. S. (2007). How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infect Immun* 75, 545-552.
- Stirling, F. R., Cuzick, A., Kelly, S. M., Oxley, D. & Evans, T. J. (2006). Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* 8, 1294–1309.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.
- Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., Chen, W., Lim, K. B., Hackett, M., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* 46, 661-676.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Strom, M. S. & Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 47, 565–596.
- Subtil, A., Parsot, C. & Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* 39, 792-800.
- Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J. & Galán, J. E. (2001). Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol* 183, 1159-1167.

- Sullivan, N. L., Tzeranis, D., Wang, Y., So, P. T. & Newman, D. (2011). Quantifying the dynamics of bacterial secondary metabolites by spectral multiphoton microscopy. *ACS Chem Biol* 6, 893–899.
- Sun, J. & Barbieri, J. T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* 278, 32794–32800.
- Sun, P., Tropea, J. E., Austin, B. P., Cherry, S. & Waugh, D. S. (2008). Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J Mol Biol* 377, 819–830.
- Sundin, C., Henriksson, M. L., Hallberg, B., Forsberg, A. & Frithz-Lindsten, E. (2001). Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell Microbiol* 3, 237–246.
- Sundin, C., Wolfgang, M. C., Lory, S., Forsberg, A. & Frithz-Lindsten, E. (2002). Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 33, 265–277.
- Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J. & Geme 3rd, St. J. W. (2004). The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* 279, 14679–14685.
- Suter, S. (1994). The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150, S118–22.
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9, 222–227.
- Sutterwala, F. S., Mijares, L. A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B. I. & Flavell, R. A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* 204, 3235–3245.
- Szabo, C. (2003). Role of flagellin in the pathogenesis of shock and acute respiratory distress syndrome: therapeutic opportunities. *Crit Care Med* 31, S39–S45.

## T

- Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. & Otani, T. (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 68, 1834–1839.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. & Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* 6, 805–816.
- Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. & Sawa, T. (2004). Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 323–331.
- Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B. & Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64, 37–43.
- Tennent, J. M. & Mattick, J. S. (1994). Type 4 fimbriae. In P. Klemm (ed.), *fimbriae: aspects of adhesion, genetics, biogenesis and vaccines*. 127–146.
- Teplitski, M., Goodier, R. I. & Ahmer, B. M. (2003). Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 185, 7257–7265.
- Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase c suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 67, 2371–2376.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I. & Elsen, S. (2009). Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem* 284, 15762–15770.

- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F. & Pierson, L. S. (1990).** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic Acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol* 56, 908-912.
- Throup, J. P., Camara, M. & Briggs, G. S., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1995).** Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 17, 345-356.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau F. & Jaeger, K. E. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313-1323.
- Tiesset, H., Pierre, M., Desseyn, J. L., Guéry, B., Beermann, C., Galabert, C., Gottrand, F. & Husson, M. O. (2009).** Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the kinetics of pro- and anti-inflammatory responses in mice with *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Nutr* 139, 82-89.
- Traidej, M., Marquart, M. E., Caballero, A. R., Thibodeaux, B. A. & O'Callaghan, R. J. (2003).** Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocesing and activation. *J Biol Chem* 278, 2549-2553.
- Troisfontaines, P. & Cornelis, G. R. (2005).** Type III secretion: more systems than you think. *Physiology* (Bethesda) 20, 326-339.
- Trunk, K., Benkert, B., Quäck, N., Münch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, M., Schobert, M. & Jahn, D. (2010).** Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* 12, 1719-1733.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T. & Sasakawa, C. (1993).** Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *J Bacteriol* 175, 6142-6149.
- Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol Microbiol* 5, 2003-2010.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I. & Vignais, P. M. (1993).** *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 416-421.
- Toutain, C. M., Zegans, M. E. & O'Toole, G. A. (2005).** Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 771-777.
- Turner, K. H., Vallet-Gely, I. & Dove, S. L. (2009).** Epigenetic control of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by a LysR-type transcription regulator. *PLoS Genet* 5, e1000779.

## U

- Umanski, T., Rosenshine, I. & Friedberg, D. (2002).** Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 148, 2735-2744.
- Urbanowski, M. L., Lykken, G. L. & Yahr, T. L. (2005).** A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9930-9935.

## V

- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2001).** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6911-6916.
- Vallis, A. J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1999).** Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* 67, 2040-2044.



- Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1999). Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infection and immunity* 67, 914-920.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C. & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50, 1361-1379.
- Van Alst, N. E., Sherrill, L. A., Iglewski, B. H. & Haidaris, C. G. (2009a). Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Can J Microbiol* 55, 1133-1144.
- Van Alst, N. E., Wellington, M., Clark, V. L., Haidaris, C. G. & Iglewski, B. H. (2009b). Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 77, 4446-4454.
- Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4, 551-560.
- van Ulsen, P., van Alphen, L., ten Hove, J., Fransen, F., vander Ley, P. & Tommassen, J. (2003). A neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* 50, 1017-1030.
- Vance, R. E., Rietsch, A. & Mekalanos, J. J. (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* 73, 1706-1713.
- Vasil, M. L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 108, 800-805.
- Vasil, M. L., Stonehouse, M. J., Vasil, A. I., Wadsworth, S. J., Goldfine, H., Bolcome, R. E. 3rd. & Chan, J. (2009). A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS Pathog* 5, e1000420.
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. & Filloux, A. (2005). The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* 151, 985-997.
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 171-176.
- Vettoretti, L., Floret, N., Hocquet, D., Dehecq, B., Plesiat, P., Talon, D. & Bertrand, X. (2009). Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1217-1222.
- Vitkauskienė, A., Skrodenienė, E., Dambrauskienė, A., Macas, A. & Sakalauskas, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina (Kaunas)* 46, 490-495.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218, 97-106.
- Vogelaar, N. J., Jing, X., Robinson, H. H. & Schubot, F. D. (2010). Analysis of the crystal structure of the ExsC.ExsE complex reveals distinctive binding interactions of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion chaperone ExsC with ExsE and ExsD. *Biochemistry* 49, 5870-5879.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* 20, 6735-6741.

Voulhoux, R., Taupiac, M. P., Czjzek, M., Beaumelle, B. & Filloux, A. (2000). Influence of deletion within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 4051–4058.

Voulhoux, R. & Tommassen, J. (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* 155, 129–135.

Vukomanovic, D. V., Zoutman, D. E., Stone, J. A., Marks, G. S., Brien, J. F. & Nakatsu, K. (1997). Electrospray massspectrometric, spectrophotometric and electrochemical methods do not provide evidence for the binding of nitric oxide by pyocyanine at pH 7. *Biochem J* 322, 25-29.

## W

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185, 2080-2095.

Waksman, G. & Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7, 765–774.

Walker, K. A. & Miller, V. L. (2004). Regulation of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* by YsaE/SycB and YsrS/YsrR. *J Bacteriol* 186, 4056-4066.

Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58, 611–647.

Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C. & Li, Y. (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* 4, 433–443.

Wang, Y., Ouellette, A. N., Egan, C. W., Rathinavelan, T., Im, W. & De Guzman, R. N. (2007). Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH. *J Mol Biol* 371, 1304–1314.

Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. & Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617.

Wangdi, T., Mijares, L. A. & Kazmierczak, B. I. (2010). In vivo discrimination of type 3 secretion system-positive and -negative *Pseudomonas aeruginosa* via a caspase-1-dependent pathway. *Infect Immun* 78, 4744-4753.

Wagner, V. E., Frelinger, J. G., Barth, R. K. & Iglewski, B. H. (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* 14, 55–58.

Ware, L. B. & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342, 1334-1349.

Warren, J. B., Loi, R., Rendell, N. B. & Taylor, G. W. (1990). Nitric oxide is inactivated by the bacterial pigment pyocyanin. *Biochem J* 266, 921-923.

Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1995). Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J* 14, 2461-2470.

Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.

Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. & Cornelis, G. R. (1994). Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10493-10497.

West, S. H. E., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. & Runyen-Janecky, L. J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 128, 81-86.

Whitchurch, C. B., Beatson, S. A., Comolli, J. C., Jakobsen, T., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., West, J., Klausen, M., Waite, L. L., Kang, P. J., Tolker-Nielsen, T., Mattick, J. S. & Engel, J. N.

- (2005). *Pseudomonas aeruginosa fimL* regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol Microbiol* 55, 1357-1378.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13904-13909.
- Whiteley, M., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 4356-4360.
- Wick, M. J., Hamood, A. N. & Iglewski, B. H. (1990). Analysis of the structure–function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a. *Mol Microbiol* 4, 527–535.
- Wieland, C. W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M. L., Dinarello, C. A. & Fantuzzi, G. (2002). Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase c, and exotoxin a: Role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70, 1352–1358.
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z. & Vasil, M. L. (2001a). Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol* 39, 291-303.
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., Wilson, M. J., Cunliffe, H. E., Lamont, I. L., & Vasil, M. L. (2001b). Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 69, 5385-5394.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger K. E. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilmformation. *J Bacteriol* 189, 6695–6703.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 6977–6986.
- Williams, A. W. & Straley, S. C. (1998). YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. *J Bacteriol* 180, 350-358.
- Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. & Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56, 2515-7.
- Winstanley, C. & Fothergill, J. L. (2009). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* 290, 1-9.
- Winstanley, C., Langille, M. G., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R. E., Brinkman, F. S. & Levesque, R. C. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19, 12-23.
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M. & Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 182, 6401–6411.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. & Cornelis, G. R. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* 176, 1561-1569.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U. K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Microbiol* 138, 1325–1335.

- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G. & Lory, S. (2003a).** Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8484-8489.
- Wolfgang, M. C., Lee, V. T. Gilmore, M. E. & Lory, S. (2003b).** Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* 4, 253-263.
- Woodruff, W. A. & Hancock, R. E. (1989).** *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J Bacteriol* 171, 3304-3309.
- Woods, D. E., Bass, J. A., Johanson, Jr. W.G. & Straus, D.C. (1980).** Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 30, 694-699.
- Worgall, S., Krause, A., Qiu, J., Joh, J., Hackett, N. R. & Crystal, R. G. (2007).** Protective immunity to *pseudomonas aeruginosa* induced with a capsid-modified Adenovirus expressing *P. aeruginosa* OprF. *J Virol* 81, 13801-13808.
- Worgall, S., Krause, A., Rivara, M., Hee, K. K., Vintayen, E. V., Hackett, N. R., Roelvink, P. W., Bruder, J. T., Wickham, T. J., Kovesdi, I. & Crystal, R. G. (2005).** Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest* 115, 1281-1289.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A. & Parsek, M. R. (2003).** Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7907-7912.
- Wretling, B. & Pavlovskis, O. R. (1984).** Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins. *J Bacteriol* 158, 801-808.
- Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J. E., Patel, N., Musch, M. W., Chang, E. B., Fu, Y. X., Jacobs, M. A., Nishimura, M. I., Hancock, R. E., Turner, J. R. & Alverdy, J. C. (2005).** Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 309, 774-777.
- Wu, W. & Jin, S. (2005).** PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol* 187, 6058-6068.
- Wulff-Strobel, C. R., Williams, A. W. & Straley, S. C. (2002).** LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol Microbiol* 43, 411-423.
- Wurtele, M., Wolf, E., Pederson, K. J., Buchwald, G., Ahmadian, M. R., Barbieri, J. T. & Wittinghofer, A. (2001).** How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac. *Nat Struct Biol* 8, 23-26.

## X

- Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M. H., Milot, S., Tampakaki, A. P., Stachel, S. E. & Rahme, L. G. (2006).** MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* 62, 1689-1699.

## Y

- Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1994).** Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176, 3832-3838.
- Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996).** Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 22, 991-1003.
- Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. M. & Frank, D. W. (1995).** Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* 177, 1169-1178.

- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998).** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13899–13904.
- Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2006).** Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 62, 631–640.
- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2009).** Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol Microbiol* 74, 1380–1392.
- Yen, Y. T., Kostakioti, M., Henderson, I. R. & Stathopoulos, C. (2008).** Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol* 16, 370–379.
- Yeo, H. J., Cotter, S. E., Laarmann, S., Juehne, T., St Geme 3rd, J. W. & Waksman, G. (2004).** Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *EMBOJ* 23, 1245–1256.
- Yip, C. K. & Strynadka, N. C. (2006).** New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci* 31, 223–230.
- Yip, C. K., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2005).** Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol* 12, 75–81.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Allen, H. L., DeKievit, T. R., Gardner, P. R., Schwab, U., Rowe, J. J., Iglewski, B. H., McDermott, T. R., Mason, R. P., Wozniak, D. J., Hancock, R. E., Parsek, M. R., Noah, T. L., Boucher, R. C. & Hassett, D. J. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3, 593–603.
- Yother, J., Chamness, T. W. & Goguen, J. D. (1986).** Temperature-controlled plasmid regulon associated with low calcium response in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 165, 443–447.

## Z

- Zegarra-Moran, O., Folli, C., Manzari, B., Ravazzolo, R., Varesio, L. & Galletta, L. J. (2004).** Double mechanism for apical tryptophan depletion in polarized human bronchial epithelium. *J Immunol* 173, 542–549.
- Zelante, T., Fallarino, F., Bistoni, F., Puccetti, P. & Romani, L. (2009).** Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* 11, 133–141.
- Zhang, L., Wang, Y., Picking, W. L., Picking, W. D. & De Guzman, R. N. (2006).** Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. *J Mol Biol* 359, 322–330.
- Zhang, L. & Mah, T. F. (2008).** Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* 190, 4447–4452.
- Zheng, Z., Chen, G., Joshi, S., Brutinel, E. D., Yahr, T. L. & Chen, L. (2007).** Biochemical characterization of a regulatory cascade controlling transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Biol Chem* 282, 6136–6142.
- Zhou, L., Wang, J. & Zhang, L. H. (2007).** Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One* 2, e1291.
- Zierler, M. K. & Galan, J. E. (1995).** Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. *Infect Immun* 63, 4024–4028.
- Zolfaghar, I., Angus, A. A., Kang, P. J., To, A., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. (2005).** Mutation of *retS*, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms. *Microbes Infect* 7, 1305–1316.

**Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J. S. & Meda, P. (2006).** Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74, 3134–3147.



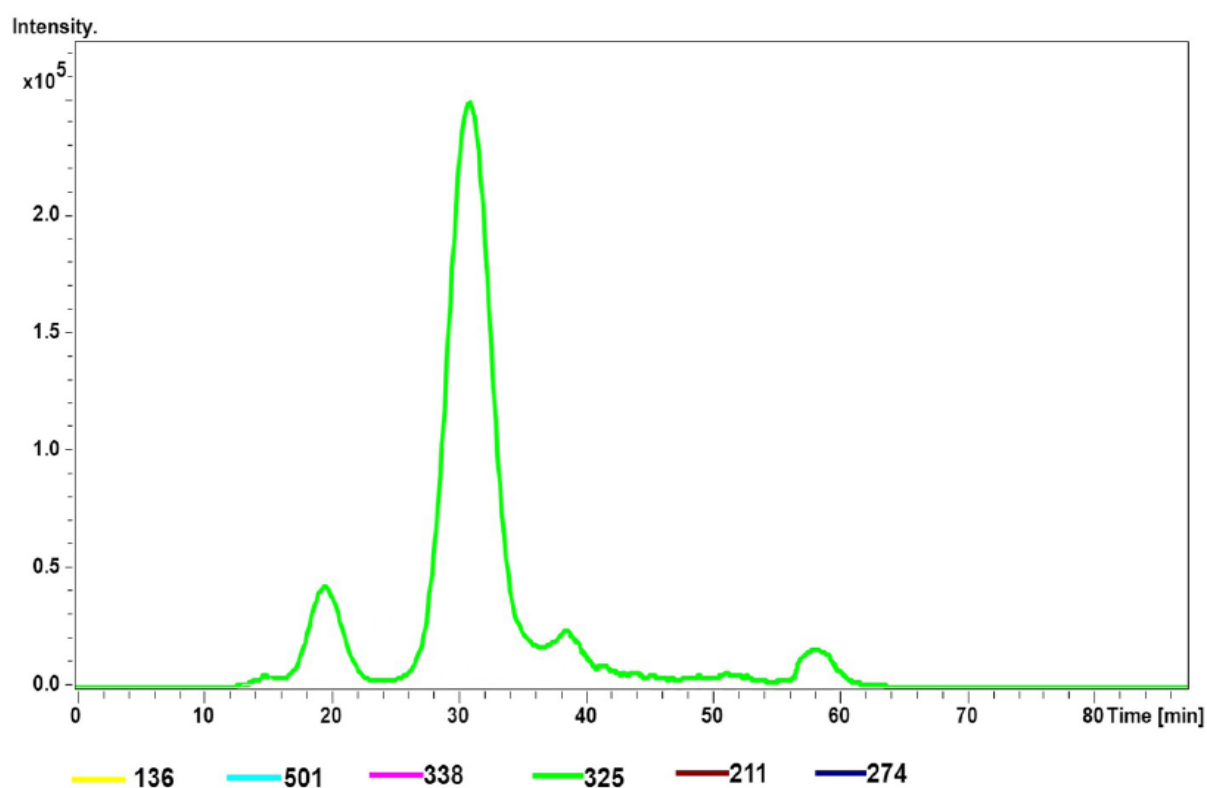
# *Annexes*





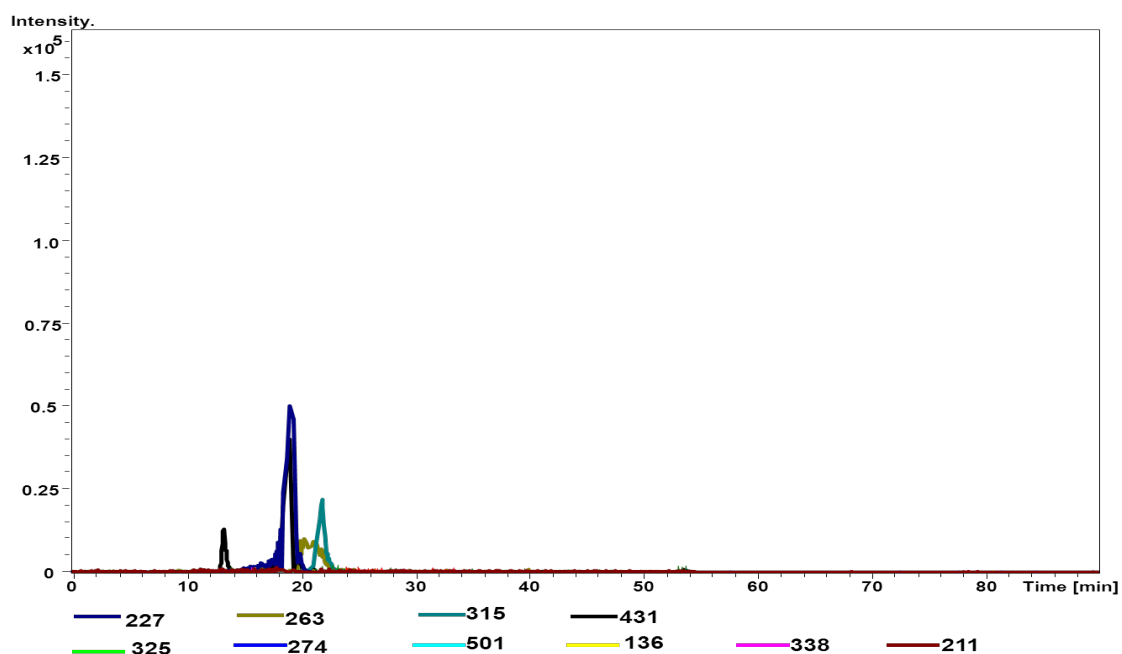
**Annexe 1.**

Pour les figures supplémentaires (suppl.) numérotées de 1 à 6, l'analyse des différents échantillons par ESI-LC/MS a été effectuée, pour des  $m/z$  comprises entre 100 et 1500 et avec une colonne en phase inverse (colonne de type C18) et une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol). Un détecteur U. V nous a permis de mesurer l'absorbance de l'échantillon à 254 nm.

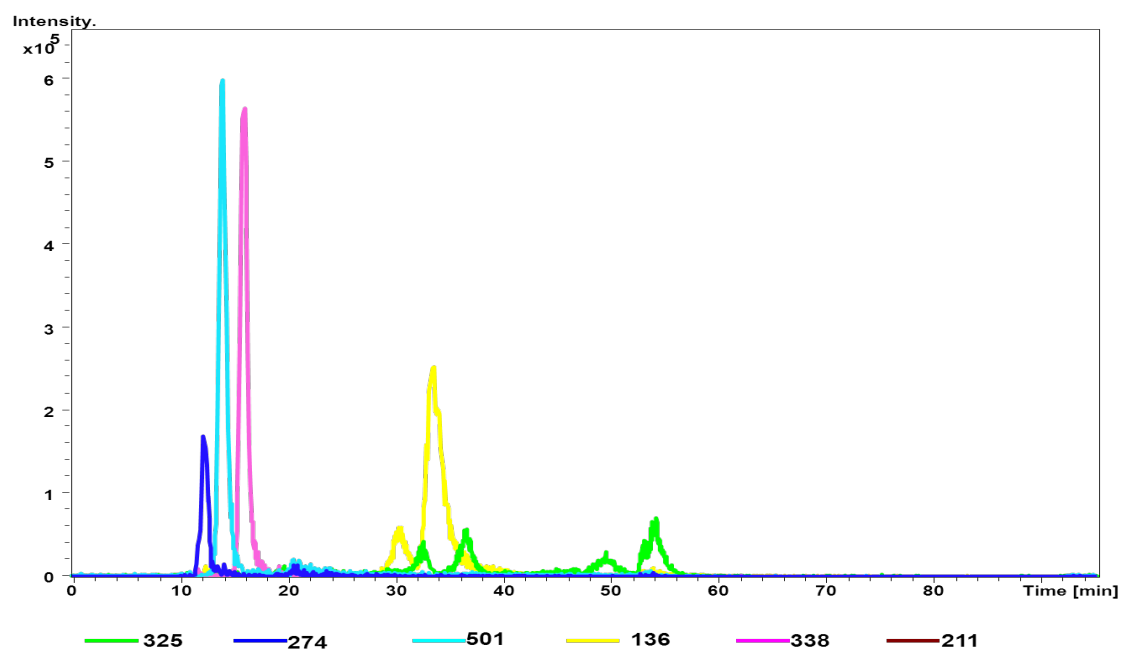


**Figure suppl. 1 : Les masses majoritaires détectées dans la fraction 3 issue du milieu VB.**

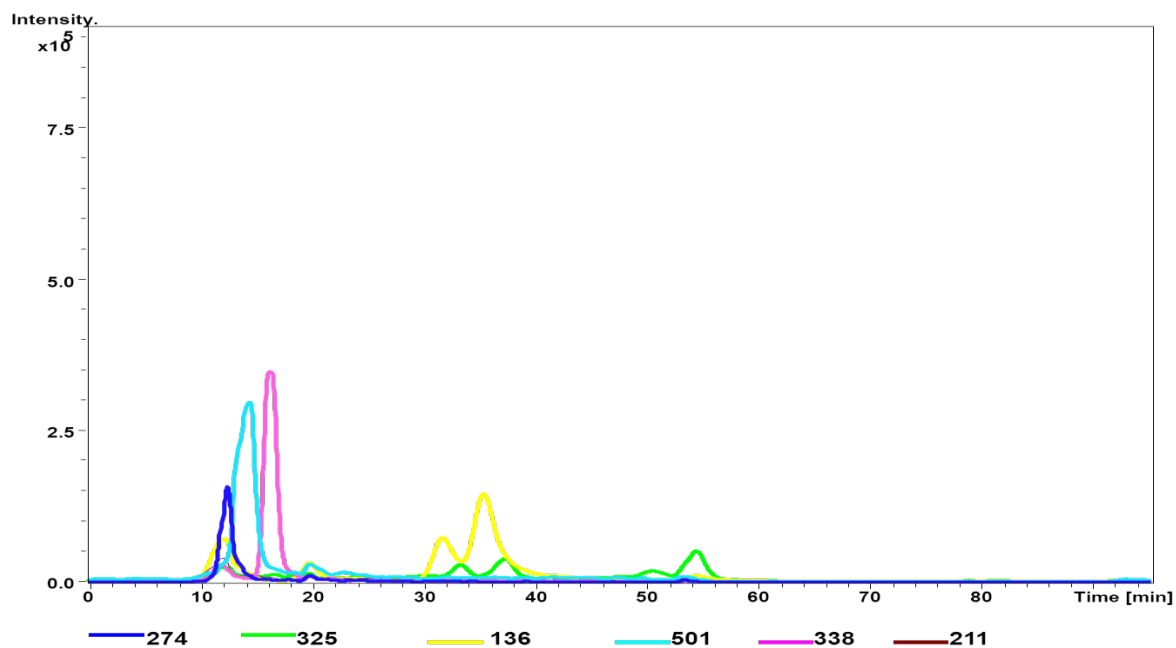
La fraction 3 issue du milieu VB et élue entre 10 et 15 min a été analysée par ESI-LC/MS.



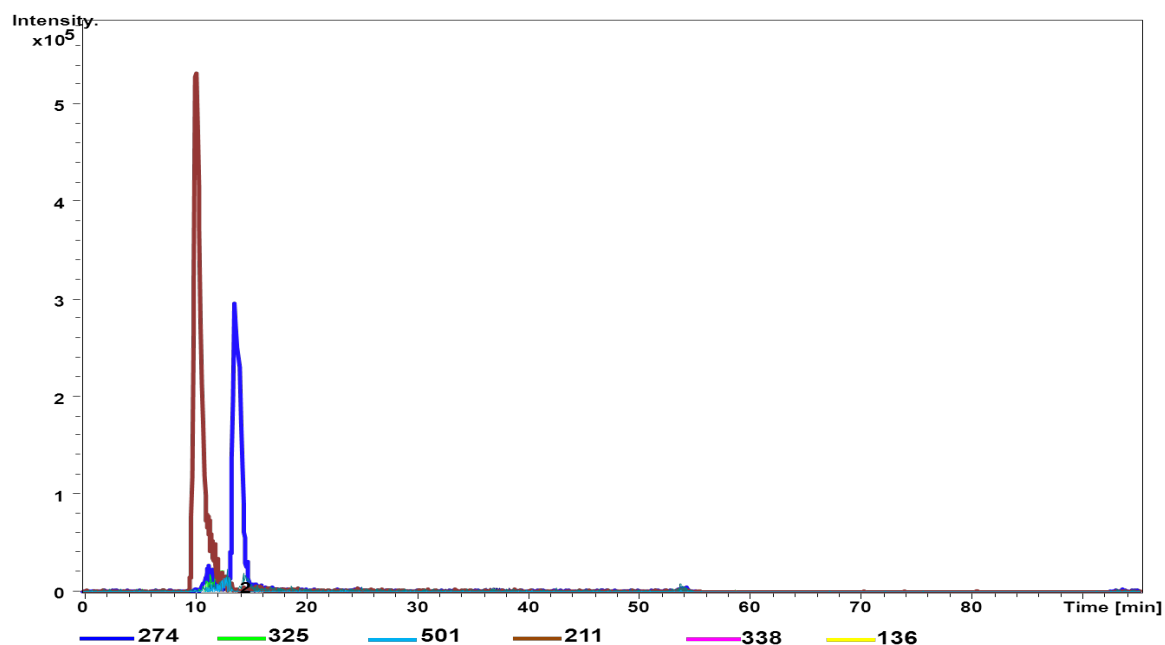
**Figure suppl. 2 : Les masses majoritaires détectées dans la sous fraction 1 de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** La sous fraction 1 éluée entre 0 et 5 minutes a été analysée par ESI-LC/MS.



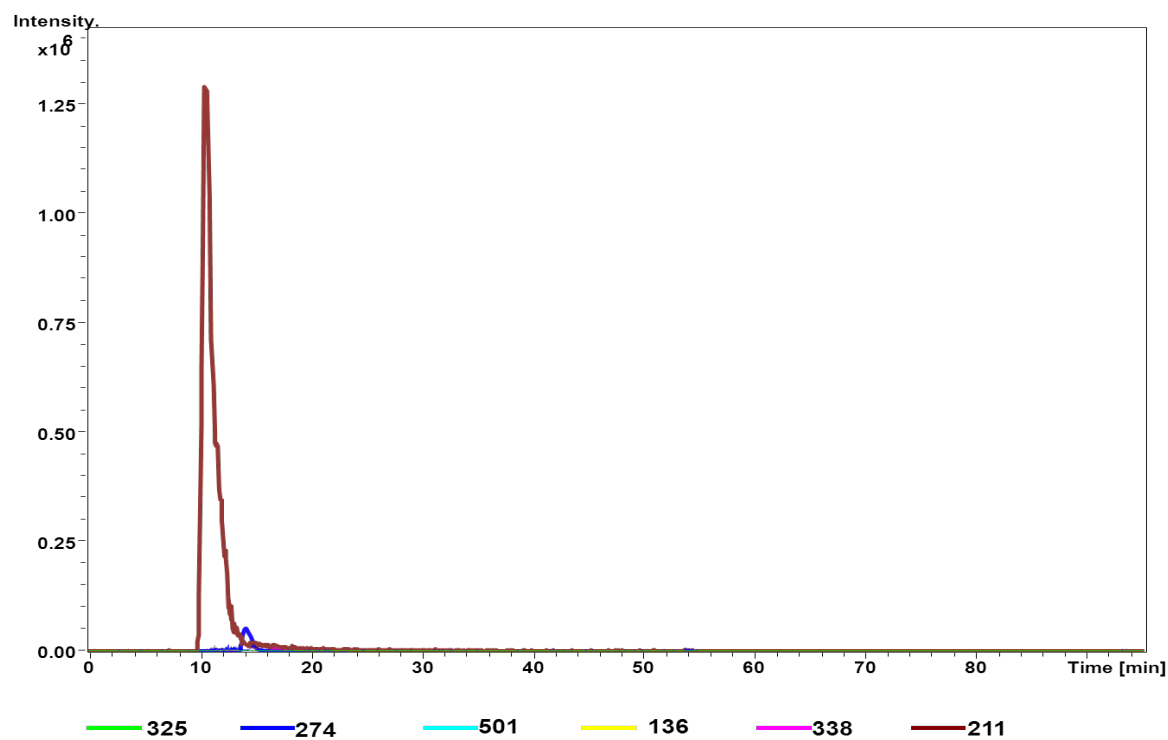
**Figure suppl. 3 : Les masses majoritaires détectées dans la sous fraction 2 de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** La sous fraction 2 éluée entre 5 et 10 minutes a été analysée par ESI-LC/MS.



**Figure suppl. 4 : Les masses majoritaires détectées dans la sous fraction 3 de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** La sous fraction 3 éluée entre 10 et 15 min a été analysée par ESI-LC/MS.



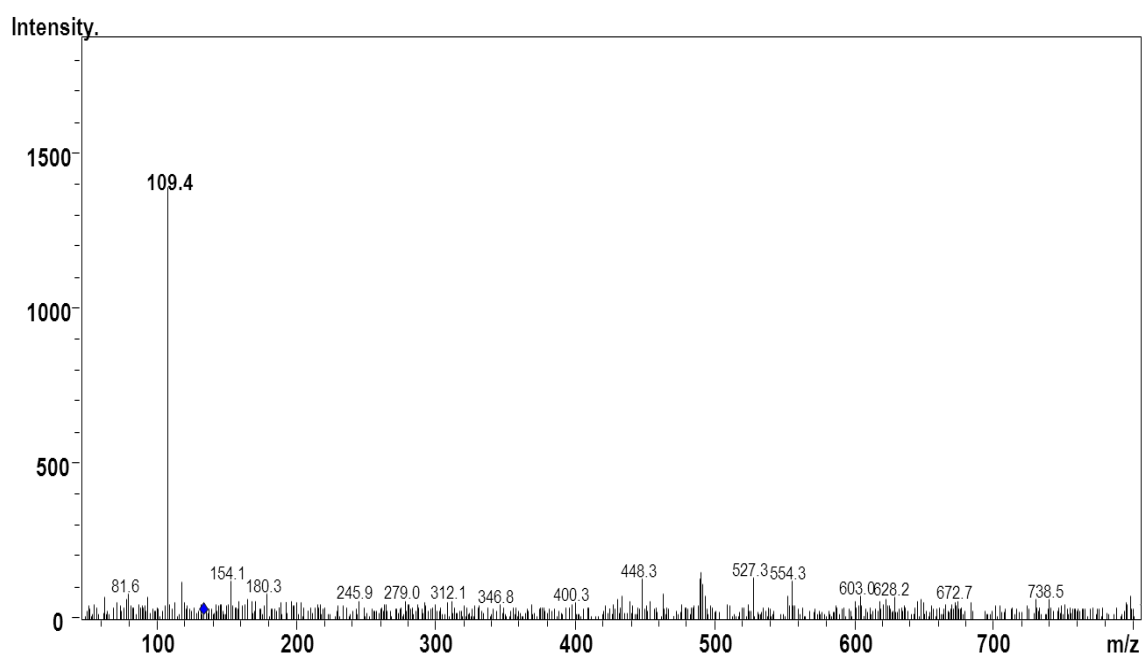
**Figure suppl. 5 : Les masses majoritaires détectées dans la sous fraction 4 de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** La sous fraction 4 éluée entre 15 et 20 min ont été analysées par ESI-LC/MS.



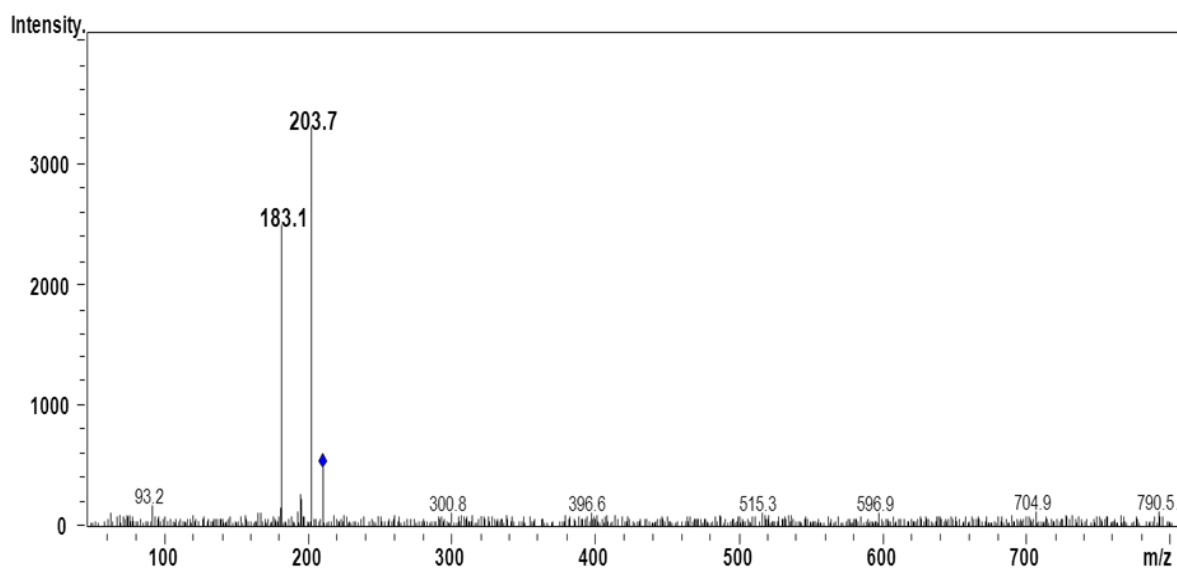
**Figure suppl. 6 : Les masses majoritaires détectées dans la sous fraction 5 de la fraction 3 issue d'un surnageant actif de la souche CHA.** La sous fraction 5 éluée entre 20 et 25 min a été analysée par ESI-LC/MS.

**Annexe 2.**

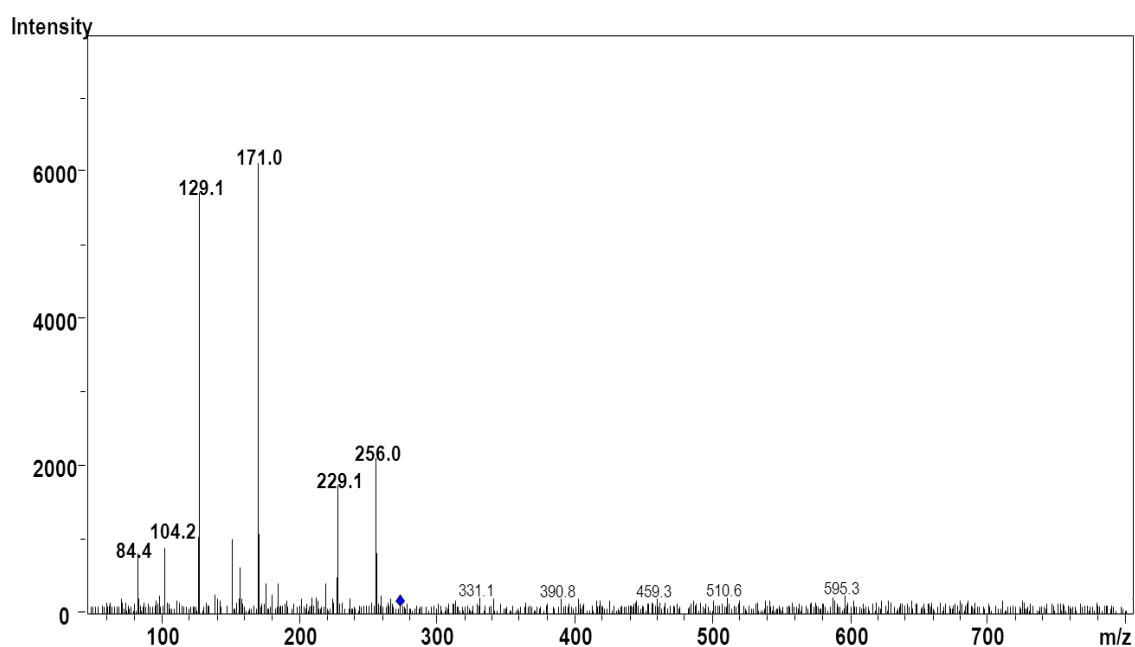
Pour les figures supplémentaires (suppl.) numérotées de 7 à 11, L'analyse par ESI-LC/MS/MS a été effectuée pour des  $m/z$  comprises entre 50 et 800. Une colonne en phase inverse a été utilisée (colonne de type C18) avec une élution isocratique méthanol/eau (50%/50% vol/vol).



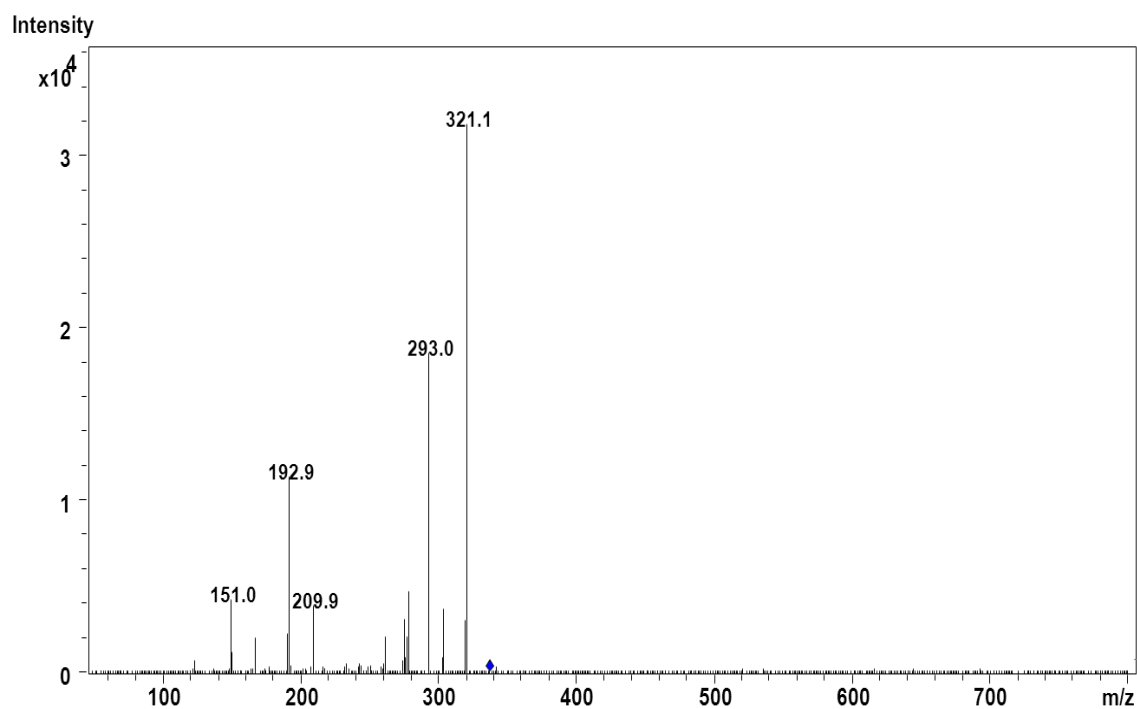
**Figure suppl. 7 : Les masses des fragments fils issus après fragmentation de la masse 136. L'espèce moléculaire d'une  $m/z$  de 136 a été fragmentée par une ESI-LC/MS/MS.**



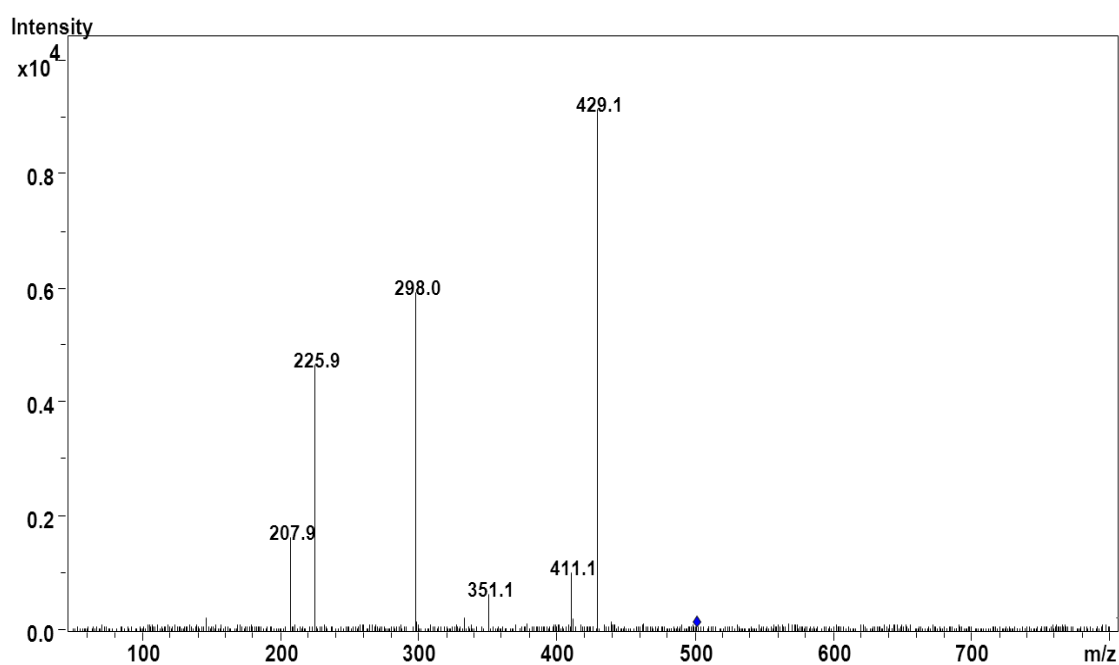
**Figure suppl. 8 :** Les masses des fragments fils issus après fragmentation de la masse **211**. L'espèce moléculaire d'une m/z de 211 a été fragmentée par une ESI-LC/MS/MS.



**Figure suppl. 9 :** Les masses des fragments fils issus après fragmentation de la masse **274**. L'espèce moléculaire d'une m/z de 274 a été fragmentée par une ESI-LC/MS/MS.



**Figure suppl. 10 :** Les masses des fragments fils issus après fragmentation de la masse **338**. L'espèce moléculaire d'une  $m/z$  de 338 a été fragmentée par une ESI-LC/MS/MS.



**Figure suppl. 11 :** Les masses des fragments fils issus après fragmentation de la masse **501**. L'espèce moléculaire d'une  $m/z$  de 501 a été fragmentée par une ESI-LC/MS/MS.





*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes. Elle possède un vaste arsenal de facteurs de virulence. Le système de sécrétion de type III (SSTT) est un facteur de virulence majeur dont la régulation est complexe pour permettre une adaptation la plus précise possible de la bactérie au cours de l'infection. Nous nous sommes intéressés à déterminer le rôle potentiel de nouveaux acteurs de l'adaptation de *P. aeruginosa* au cours de l'infection. La porine OprF qui représente la protéine la plus abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa* lui permettrait d'évaluer l'état d'activation du système immunitaire de son hôte afin d'adapter sa virulence. Chez *P. aeruginosa*, le tryptophane est le précurseur des kynurénines qui sont également produites par l'hôte à partir du tryptophane et qui, dans ce dernier contexte, sont des immunomodulateurs. Peu ou pas d'études ont été réalisées pour mettre en œuvre un éventuel rôle d'immunomodulation ou dans la virulence des kynurénines bactériennes.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à un signal anciennement découvert au laboratoire et qui réprime l'expression du SSTT à haute densité bactérienne. Nous avons montré que ce signal exerce une régulation post-transcriptionnelle en plus d'une inhibition de la transcription des gènes du SSTT. Le métabolisme du tryptophane et de l'antranilate semble être au cœur de ce processus de régulation. En inactivant des voies du catabolisme du tryptophane, nous avons montré que la production de ce signal dépend partiellement de la voie des kynurénines mais ne dépend pas ni des voies classiques du quorum sensing ni de l'opéron *phnAB*, impliqué dans la synthèse de l'antranilate. Cependant, la voie des phénazines pourrait être impliquée dans la production de ce signal. Par CLHP couplée à la spectrométrie de masse, nous avons pu séparer des espèces moléculaires réprimant le SSTT et qui sont contenues dans ce signal, mais l'identification précise nécessite plus d'investigations.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux kynurénines produites par la bactérie. Nous avons confirmé que *P. aeruginosa* produit des kynurénines et le gène *kynA* est le gène clé de la voie de synthèse de ces métabolites. En utilisant des fusions transcriptionnelles, nous avons montré que le tryptophane et la kynurénine régulent positivement la production des kynurénines en agissant sur l'expression des gènes clés. D'autre part, nous avons remarqué que la bactérie module l'activité de la voie métabolique des kynurénines issues du tryptophane en fonction de son état de croissance. Nous avons montré qu'au cours du dialogue inter-règne bactérie/hôte, la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est stimulée par certains composants du système immunitaire. Grâce à un modèle d'infection pulmonaire aiguë, nous avons prouvé que les kynurénines produites par la bactérie sont importantes pour sa virulence. Selon notre hypothèse les kynurénines pourraient avoir une action sur la réponse immune, mais cela reste à déterminer.

Dans un troisième temps, nous nous sommes focalisés sur la porine OprF. Nous avons montré que la mutation  $\Delta oprF$  est à l'origine d'une altération de la production mais vraisemblablement pas de la sécrétion des exotoxines du SSTT. Un ligand connu d'OprF, l'interféron gamma, module la voie des kynurénines. OprF pourrait donc avoir un rôle central dans les différents aspects de la régulation de la virulence. Nous avons donc produit des anticorps monoclonaux anti-OprF. Ces derniers se sont révélés capables de reconnaître spécifiquement la protéine OprF. Afin de vérifier l'efficacité de ces anticorps, des expériences de neutralisation de la bactérie *in vitro* puis *in vivo* seront réalisées.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Système de Sécrétion de Type III, régulation, catabolisme du tryptophane, kynurénines, OprF.

---

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.