



Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*

Rana Barakat

► To cite this version:

Rana Barakat. Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS369 . tel-00825873

HAL Id: tel-00825873

<https://theses.hal.science/tel-00825873>

Submitted on 24 May 2013

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.

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

UFR Sciences Fondamentales et Sciences pour l'Ingénieur

Laboratoire Littoral ENvironnement Sociétés (LIENSs)-UMR 7266

THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Rana BARAKAT

Le 7 décembre 2012

**Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la
pyocyanine, pigment redox-actif produit par
*Pseudomonas aeruginosa***

Jury :

Nicole ORANGE	Professeur à l'université de Rouen	Rapportrice
Christine BAYSSE	Maître de conférences à l'université de Rennes 1	Rapportrice
Marianne GRABER	Professeur à l'université de la Rochelle	Examinatrice
Stephen MANON	Chargé de recherche CNRS à l'IBGC Bordeaux	Examineur
Jean Marie PIOT	Professeur à l'université de la Rochelle	Examineur
Eric ROSENFELD	Maître de conférences à l'université de la Rochelle	Directeur de thèse
Isabelle GOUBET	Maître de conférences à l'université de la Rochelle	Co-directrice de thèse

À mes parents qui ont toujours été à mes côtés

Ce travail a été soutenu et financé par la Région Poitou-Charentes.

Remerciements

Voilà, c'est fait ! Ces trois années de thèse sont déjà terminées.

Tout d'abord, je remercie les membres du jury d'avoir accepté de participer à l'évaluation de cette thèse. Je remercie Madame Nicole ORANGE et Madame Christine BAYSSE d'avoir accepté d'être les rapportrices de ce travail. J'exprime également tous mes remerciements à Monsieur Jean-Marie PIOT et Monsieur Stephen MANON pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Madame Marianne GRABER pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche durant mes trois années de doctorat.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mademoiselle Isabelle GOUBET, pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse, pour son écoute, son suivi et sa disponibilité. Je te remercie car j'ai pu m'épanouir sur le plan scientifique et humain au cours de ces trois années.

Je tiens à remercier Monsieur Eric ROSENFELD pour avoir assuré la direction de cette thèse pendant deux ans, pour m'avoir confié ce projet de recherche et pour toutes les connaissances qu'il m'a apportées tant au niveau fondamental que technique.

Je remercie Betty, ma collègue de bureau, de m'avoir écoutée, conseillée. Merci également pour toutes les discussions et moments partagés ensembles.

Je remercie également Ophélie et Rafik pour les travaux réalisés durant leur stage et pour leur contribution à l'avancée de mon projet de thèse.

Je tiens aussi à remercier sincèrement Viviane BIOU l'adorable secrétaire et Valérie SOPENA pour sa bonne humeur et ses conseils très souvent pertinents en microbiologie.

Je remercie très chaleureusement mes amis du laboratoire : Rachida, Géraldine, Yesmine, Anne Laure, Ibtissem, Oussama, Nicolas, Hervé, Régis, Ludovic, Florian...

Il y a aussi ceux qui n'étaient pas au labo mais qui ont vécu cette thèse avec moi. Je tiens à remercier tous mes ami(e)s libanai(e)s Mohammad, Arij, Zein, Majed, namaat Lausanne, Fadia, Khouloud, Raghda, Ayman... Ma meilleure amie Rima, tu ne pourras pas être là pour ma soutenance, mais combien de fous rires, de moments inoubliables, d'histoires de fous on a partagé ? Cette thèse, elle t'est dédiée mon amie.

Enfin, je voudrais dire un merci ou plutôt milles mercis à mes supporters no. 1, mes parents, pour leurs encouragements, support moral et financier mais surtout pour leur dévouement infini tout au long de mes études!!! Mes deux sœurs et mon frère qui m'ont toujours encouragés, écoutés et qui été pour moi un exemple de force dans les moments difficiles. Cette thèse est la votre aussi.

Tables des matières

Exposé Bibliographique 1

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa* 2

1. Caractéristiques générales du bacille pyocyannique 2
2. Métabolisme énergétique et chaîne respiratoire 3
3. Distribution environnementale et vie en biofilm 11
4. Implications cliniques de *Pa* 14
 - a. L'infection aiguë 15
 - b. L'infection chronique 15
 - c. Implication chez les patients atteints de mucoviscidose 16
5. Facteurs de virulence 17
6. Régulation de l'expression des facteurs de virulence 21
 - a. Quorum Sensing 21

Chapitre II : Les phénazines et la pyocyanine 26

- A. Les phénazines 26**
 1. Généralités 26
 2. Biosynthèse 26
 3. Rôle chez les bactéries productrices 29
- B. La pyocyanine (PYO) 32**
 1. Importance de la PYO pour la pathogénicité de *P. aeruginosa* 33
 2. La PYO génératrice de stress oxydatif 35
 - a. Activation de la PYO par les agents réducteurs 36
 - b. Toxicité de la PYO envers les cellules bactériennes (stress oxydatif) 38
 - c. L'effet de la PYO et de ses précurseurs sur les levures 39
 - d. Toxicité de la PYO envers les cellules des mammifères (stress oxydatif) 43
 - e. Interaction de la PYO avec les systèmes de défense antioxydants et antimicrobiens de l'hôte 46
 3. Interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire 48

a. Interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire des <i>Staphylocoques</i>	52
4. Les bénéfices de la PYO chez <i>P. aeruginosa</i>	54
Contexte et Objectifs de l'étude	60
Matériel et Méthodes	63
1. Matériel biologique	64
a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA14).....	64
b. Autres bactéries.....	65
c. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
d. Conservation des souches	67
2. Milieux et conditions de culture	68
a. Milieux riches	68
b. Milieux synthétiques et tampons.....	69
c. Stérilisation des milieux.....	73
d. Conditions de culture	73
i. Précultures aérobies	73
ii. Cultures aérobies.....	73
iii. Suivi cinétique de PA14.....	73
iv. Cultures hypoxies.....	74
v. Précultures anaérobies.....	74
vi. Cultures anaérobies	74
vii. Culture avec supplémentation en molécules antioxydantes	75
viii. Culture avec supplémentation en catalase.....	76

3. Activité antimicrobienne de la PYO	77
a. Suivi de la multiplication cellulaire	77
b. Détermination de la viabilité cellulaire	77
c. Test des sondes fluorescentes pour le dosage des ROS	78
d. Dosages des produits de fermentation	79
i. Dosage du glucose et du glycérol par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP)	79
ii. Dosage de l'éthanol par chromatographie en phase gazeuse (CPG):.....	79
e. Mesure des spectres d'absorption de la PYO.....	80
 4. Mesure de la vitesse de consommation d'O₂.....	80
a. L'électrode de mesure (électrode de Clark)	80
b. L'oxygraphe "classique"	81
c. L'oxygraphe haute résolution O ₂ K-Oroboros	82
d. Calibration des flux d'oxygène	84
i. Saturation totale en O ₂	84
ii. Calibration à 0 % en O ₂	84
e. Mesure de flux spécifique de consommation d'O ₂ (JO ₂).....	85
i. Mesure de JO ₂ des souches d'intérêt (levures et bactéries)	85
ii. Mesure de JO ₂ de PA14	85
iv. Utilisation des effecteurs et inhibiteurs du JO ₂	86
5. Préparation des cellules perméabilisées de PA14	87
 6. Préparation des sphéroplastes	88
 7. Mesure du taux de réduction de la PYO par PA14	88

Résultats et Discussion.....89

Chapitre 1 : Étude de la toxicité de la pyocyanine envers *S. cerevisiae* : un modèle de cellule eucaryote.90

1. Intérêt de la levure pour l'étude de la toxicité de la PYO	91
a. Particularités de <i>S. cerevisiae</i>	91
b. Utilisation de sondes fluorescentes avec la PYO.....	92
c. Phénotypes des souches utilisées	93
d. Sensibilité des souches utilisées à l'H ₂ O ₂	95
2. Effet de la PYO sur la croissance de <i>S. cerevisiae</i>	98
A. Sensibilité à la PYO en aérobie.....	99
a. Sur milieu YPD.....	99
b. d milieu YEPGly.....	101
c. Sur milieu SM.....	102
d. Souches délétées dans les pompes d'efflux	103
e. Effets des antioxydants	105
i. Effets des antioxydants non enzymatiques	106
ii. Effet de l'ajout de catalase	107
B. Sensibilité à la PYO en anaérobiose	108
a. La Viabilité cellulaire.....	114
b. Recouvrement de la PYO.....	114
c. Effets des antioxydants	115
3. Effet de la PYO sur la respiration de <i>S. cerevisiae</i>	116
A. Mesure de la consommation d'O ₂ en absence et en présence de PYO ("JO ₂ spécifique").	116
a. Respiration des cellules en culture.....	116
b. Respiration des cellules lavées.....	117
c. Respiration mitochondriale.....	120
4. Conclusion sur la toxicité de la PYO envers <i>S. cerevisiae</i>	123

Chapitre 2 : Étude de l'activité antibactérienne de la pyocyanine.....124

1. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées lors de cette étude	125
2. Effet de la PYO sur la croissance bactérienne	127
A. Sensibilité à la PYO en aérobie.....	127
a. Sur milieu riche.....	127
b. Sur milieu défini.....	132
B. Sensibilité à la 1-hydroxyphénazine en aérobie.	136
C. Sensibilité à la PYO en anaérobie.....	138
a. Sur milieu BHI additionné de glucose	138
b. Sur milieu BHI additionné de glucose et de KNO ₃	139
3. Effet de la PYO sur la respiration bactérienne.....	141
A. Respiration des cellules en culture.....	141
B. Respiration des cellules lavées.....	143
4. Conclusions sur l'activité antibactérienne de la PYO.....	150

Chapitre 3 : Caractérisation de l'effet de la pyocyanine sur la respiration de *P. aeruginosa*.....152

1. Description des mutants utilisés.....	153
2. Cinétiques de croissance	156
3. Suivi du taux de réduction de la PYO par PA14.....	156
4. Effet de la PYO sur la respiration de PA14.....	158
A. Respiration des cellules en culture.....	158
B. Respiration des cellules lavées.....	159
a. Effet de la PYO sur la respiration endogène (après culture sur succinate)	159
b. Effet de la PYO sur la respiration endogène (après cultures sur glucose et sur lactate) .	160
c. Effet de la PYO sur la respiration sur succinate ou sur D-L lactate (après culture sur succinate ou sur D-L lactate)	161
C. Effet de la PYO sur la respiration des mutants de la chaîne respiratoire de PA14	162

D.	Effet de poisons respiratoires	165
a.	Effet de poisons autres que le cyanure.....	165
b.	Effet du cyanure.....	167
c.	Utilisation des cellules perméabilisées.....	169
5.	Effet de la PYO sur la respiration de PA14 sous différentes tensions d'O ₂	172
6.	Affinité de PA14 pour l'O ₂	173
7.	Effet de la phénazine méthosulfate (PMS) sur la respiration de PA14.....	175
8.	Conclusion sur les effets de la PYO sur la respiration de PA14.....	176
Conclusion et Perspectives		178
Références Bibliographiques		188

ABBREVIATIONS

CF	: Cystic Fibrosis
CN ⁻ (ou KCN)	: Cyanure (de potassium)
DHR 123	: Dihydrorhodamine 123
DO	: Densité optique
e ⁻	: Electron(s)
FA	: Facteurs anaérobies
GR	: Glutathion réductase
GSH/GSSG	: Glutathion réduit/oxydé
H ₂ DCFDA	: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate
HQNO	: 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide
JO ₂	: Flux de consommation d'O ₂
LDH	: Lactate déshydrogénase
NAD(P)H	: Nicotinamide adénosine dinucléotide (phosphate) réduit
nm	: Nanomètre(s)
O ₂	: Oxygène moléculaire
O ₂ ⁻	: anion superoxyde
<i>Pa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PYO	: Pyocyanine
PMS	: Phénazine méthosulfate
QS	: Quorum sensing
ROS	: Formes réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RPE	: Résonance Paramagnétique Electronique
rpm	: Rotations par minute

SDH : Succinate déshydrogénase

SOD : Superoxyde dismutase

Exposé Bibliographique

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*

1. Caractéristiques générales du bacille pyocyanique

En 1862 Luke a observé pour la première fois des particules de forme circulaire dans un pus de coloration bleu-vert. Les mêmes observations ont été réalisées par Sedillot et quelques années plus tard en 1882, Gessard a isolé *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus*, du nom du pigment pyocyanique (la pyocyanine), diffusible dans le milieu extracellulaire et à l'origine de la coloration des cultures.

Pa est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*.

Pa est le principal représentant du genre *Pseudomonas*. Il s'agit d'un bacille Gram négatif non sporulant. Il mesure 1 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large (**Figure 1**) et est mobile grâce à un flagelle polaire.

Cette bactérie mésophile est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 15 à 42°C. La température optimale de croissance est 37°C.



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

2. Métabolisme énergétique et chaîne respiratoire

P. aeruginosa est souvent décrite comme ayant un métabolisme strictement oxydatif et/ou respiratoire. Elle est en fait capable de respirer en aérobie et anaérobie et elle peut aussi fermenter l'arginine et le pyruvate. Ces caractéristiques lui permettent de se développer dans des niches écologiques très variées bien que l'aérobie soit la condition optimale pour son développement.

En aérobie, *Pa* utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Elle est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie, dans un milieu minéral simple (Stanier et al., 1966). Grâce à diverses enzymes périplasmiques, elle est également capable d'hydrolyser de nombreuses macromolécules qui peuvent alors lui servir de sources d'énergie pour sa croissance. Le glucose est catabolisé via la voie d'Entner-Doudoroff. Le catabolisme des acides organiques et aminés est associé aux cycles de Krebs et du glyoxylate qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme de cette bactérie.

En absence d'oxygène, *Pa* peut utiliser d'autres accepteurs finaux d'électrons. Cette propriété lui permet de croître en anaérobiose dans des milieux très divers, à condition qu'un accepteur convenable d'électrons soit présent, en particulier les nitrates ou les nitrites. Elle peut également tirer son énergie en anaérobiose en hydrolysant l'arginine grâce à un système enzymatique dénommé « Arginine-dihydrolase constitutive » (Stanier et al., 1966). Cependant la fermentation de l'arginine ne peut être réalisée que sur un milieu riche et ne permet qu'une faible croissance. Les enzymes de cette voie métabolique sont réprimées en présence de nitrates, ce qui implique qu'en anaérobiose et en présence de nitrates *Pa* utilise préférentiellement la dénitrification plutôt que la fermentation. *P. aeruginosa* possède dans son génome un gène codant pour une D-lactate déshydrogénase cytoplasmique. Cette enzyme permet à la bactérie de fermenter le pyruvate mais ce substrat ne permet pas une croissance significative en anaérobiose. Le pyruvate permet cependant à *Pa* de survivre en absence d'O₂ (Williams et al., 2007; Price-Whelan et al., 2007).

La chaîne respiratoire de *Pa*, est complexe et fortement ramifiée. Elle est encore imparfaitement caractérisée, et elle comprend cinq composants majeurs (**Figure 3**) :

- Plusieurs déshydrogénases primaires membranaires; au moins 17 déshydrogénases peuvent être exprimées et peuvent oxyder un substrat spécifique tel que le NADH, le succinate, le lactate, le glucose ou le gluconate et transférer les électrons à un pool de quinones. Peu de ces déshydrogénases ont pu être purifiées mais leur implication a été déduite à partir de l'analyse du génome. Les trois types de NADH déshydrogénase pouvant exister chez les bactéries sont retrouvées dans le génome de *Pa* (Williams et al., 2007). Outre la succinate déshydrogénase, de nombreuses autres déshydrogénases inductibles sont retrouvées : deux possibles L-lactate déshydrogénases, des déshydrogénases d'acides aminés, une glycérol-phosphate déshydrogénase et enfin des déshydrogénases à pyrroloquinoline quinone : deux malate déshydrogénases, une glucose et une gluconate déshydrogénase ainsi qu'une éthanol déshydrogénase.

- L'ubiquinone-9, molécule liposoluble présente dans la bicouche lipidique de la membrane interne bactérienne, sert d'intermédiaire dans le transport des électrons entre d'une part les déshydrogénases primaires et d'autre part le complexe bc₁ ou les oxydases

terminales. Des études ont clairement mis en évidence que cette molécule est la quinone majoritairement extraite à partir des membranes de *Pa* cultivée en aérobiose et qu'elle est essentielle pour sa respiration (Matsushita et al., 1979). Les données bibliographiques ne mentionnent pas si ce même type de quinone est aussi impliqué lors de la respiration anaérobie. Il n'existe par contre pas de gènes associés à la synthèse de ménaquinones chez *Pa*. Les naphthoquinones ne seraient donc pas impliquées dans le transfert d'électrons chez *Pa*.

- L'ubiquinol cytochrome c réductase, aussi appelé complexe bc₁ ou complexe III, permet le transfert d'électrons de l'ubiquinone-9 au cytochrome c et est un site de translocation de protons. Ce complexe a été peu étudié et est encore mal caractérisé chez *Pa* mais des expériences ont montré sa possible implication à la fois lors d'une respiration aérobie ou anaérobie (Matsushita et al., 1983; Ray et Williams, 1997; Hasegawa et al., 2003).

- Le cytochrome c et l'azurine (protéine-cuivre bleue), deux petites molécules présentes dans le périplasma, assurent le transfert d'électrons du complexe cytochrome bc₁ vers les cytochromes oxydases ou réductases terminales (**Figure 3**). L'azurine est induite en condition de limitation en O₂ (Hogardt et Heesemann, 2010).

- Les oxydases terminales, chargées de réduire l'O₂ en H₂O. *Pa* possède cinq oxydases terminales (**Figure 2**) :

Trois cytochrome c oxydases : la cbb₃-1 oxydase, la cbb₃-2 oxydase et la aa₃ oxydase

Ces trois oxydases font partie de la super-famille des oxydases à hème-cuivre. Elles sont donc sensibles au cyanure. Parmi elles se trouvent deux cytochrome c oxydases de type cbb₃, oxydases exclusivement trouvées chez les bactéries et présentant généralement une forte affinité pour l'O₂ et une faible efficacité de translocation de protons.

En utilisant des quadruples mutants, Arai (2011) a vérifié que les deux cytochrome c oxydases de type cbb₃ de *Pa* présentent bien une forte affinité pour l'O₂. Bien que ces oxydases soient généralement utilisées par les bactéries en condition de limitation en O₂ (Arai, 2011), chez *Pa* l'oxydase cbb₃-1 serait exprimée à différentes concentrations en O₂

mais en particulier en condition aérobie, lors de la phase exponentielle de croissance (Williams et al., 2007; Arai, 2011). Alvarez-Ortega et Harwood, (2007) ont étudié son expression en fonction de la teneur en O₂ du milieu et n'ont observé une diminution de son expression que lors d'une très forte limitation en O₂. Ces auteurs ont suggéré que l'expression de cette oxydase à différentes teneurs en O₂ et notamment en conditions aérobie pourrait conférer un avantage à *Pa*. En effet cela lui permettrait de pouvoir s'adapter très rapidement à une chute brutale de la concentration en O₂. Son inactivation par mutation diminue le taux de croissance et induit un phénotype « petites colonies ».

Inversement, l'oxydase *cbb₃-2* est exprimée lors d'une limitation en O₂ (Comolli et Donohue, 2004; Alvarez-Ortega et Harwood, 2007) et son expression est amplifiée par le régulateur transcriptionnel Anr (Anaerobic Regulator of arginine deimidase and nitrate reduction), véritable capteur sensible à l'O₂. L'activité des oxydases *cbb₃-1* et *cbb₃-2* influe sur l'expression de l'oxydase CIO, décrite ci-après. Ce contrôle se ferait via le système à deux composant RoxSR (Comolli et Donohue, 2004).

Une troisième cytochrome c oxydase peut être présente dans la chaîne respiratoire de *Pa*. C'est une cytochrome c oxydase de type aa₃. Son rôle est moins clair que celui des deux précédentes et les conditions favorisant son expression ne sont pas encore complètement élucidées. Son expression en conditions aérobie est faible mais elle est induite en phase stationnaire de croissance (Schuster et al., 2004) et peut être induite par une limitation en carbone, azote ou fer (Kawakami et al., 2010). Le promoteur de cette oxydase est activé par le facteur sigma RpoS, produit durant la phase stationnaire et est réprimé par RoxSR.

En 2011 Arai a montré que son affinité pour l'O₂ est nettement moins élevé que celui des cytochromes c oxydases de type *cbb₃* avec un Km pour l'O₂ dix fois plus important. Cependant c'est l'oxydase terminale qui présente la plus forte efficacité de translocation de protons parmi l'ensemble des oxydases terminales ($H^+/O = 6$). Il est ainsi possible que cette oxydase ne soit produite qu'en limitation nutritionnelle alors qu'une production efficace d'énergie est nécessaire. Elle représenterait un avantage pour *Pa* dans l'environnement où peu de sources de carbone, d'azote ou de fer sont disponibles mais ne serait que peu exprimée lors d'une culture sur milieu riche.

Deux quinol oxydases : la bo_3 quinol oxydase (Cyo) et la « cyanide-insensitive oxydase » (CIO) peuvent être présentes chez *Pa* (**Figure 2**).

La première de ces deux quinol oxydases est une oxydase à hème-cuivre, homologue de la cytochrome c oxydase, mais contenant un hème b et un hème o. Elle ne possède pas de site de liaison pour le cytochrome c et reçoit ses électrons directement de l'ubiquinol.

Cette oxydase présente une faible affinité pour l' O_2 et une efficacité de génération de gradient de protons intermédiaire ($H^+/O = 4$). Les conditions dans lesquelles son expression est induite ne sont pas encore complètement connues. Son expression est cependant réduite lors de l'entrée en phase stationnaire ou à de faibles teneurs en O_2 (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007). De plus il a été montré par Ochsner et al. (2002) puis par Kawakami et al. (2010), qu'elle est produite lors d'une limitation en fer et que son expression est régulée par le facteur de régulation Fur (Ferric Uptake Regulator). Comme elle comporte moins d'atomes de fer que les autres oxydases et que la chaîne de transfert d'électrons qui conduit à cette oxydase ne comprend ni le complexe bc_1 ni le cytochrome c, il est logique que cette voie et l'expression de cette oxydase soit privilégiées lors d'une carence en fer.

La quinol oxydase CIO, codée par l'opéron *cioAB*, est dépourvue de cuivre. Elle présente une forte homologie avec les oxydases à cytochrome bd, comme celle déjà identifiée et caractérisée chez *E. coli*. Elle ne présente pas d'homologie avec les membres de la super famille des oxydases à hème-cuivre.

Contrairement aux autres oxydases, la quinol oxydase CIO est résistante au HCN (1 mM) (Williams et al., 2007), ce qui permet à la bactérie de respirer dans un environnement qu'elle a elle-même rendu hostile en produisant du HCN. Les oxydases à cytochrome bd présentent généralement une forte affinité pour l'oxygène, ce qui était aussi admis pour CIO (Comolli et Donohue, 2004). Alvarez-Ortega et Harwood (2007) ont ainsi mis en évidence qu'un triple mutant ne possédant pas les oxydases *cbb₃-1* et *cbb₃-2* ni CIO ne peut pas croître en conditions micro-aérophiles alors que le double mutant Δcbb_3-1 et Δcbb_3-2 en est capable, bien que plus lentement que la souche parentale.

Cependant Arai (2011) a récemment contesté la faible affinité de CIO pour l'oxygène, ce qui contredit les données de Comolli et Donohue (2004). En construisant un quadruple mutant pour les quatre autres oxydases, il a montré que CIO posséderait une faible affinité pour l'oxygène, comparable à celles de la cytochrome c oxydase aa₃ ou à la Cyo. Ces données récentes sont surprenantes car la CIO est induite en phase stationnaire et/ou en conditions micro-aérophiles (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007).

La teneur en oxygène n'est pas le signal qui induit directement la synthèse de CIO. Le cyanure est un inducteur puissant de cette protéine. En l'absence d'O₂, CIO est fortement réprimée via le facteur transcriptionnel Anr.

Il est intéressant de noter que des doubles mutants Δcbb_3-1 et Δcbb_3-2 ou le triple mutant Δcbb_3-1 , Δcbb_3-2 et ΔCIO ont une capacité réduite à former des biofilms : ces mutants forment des biofilms plus plats et moins denses que les souches parentes (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007). L'addition de nitrates, permettant une respiration anaérobie, restaure la capacité des double et triple mutants à former des biofilms (similaires à la souche sauvage). De plus, dans des biofilms de 96 h l'ensemble des cellules sont viables alors que les cellules situées à l'intérieur des biofilms obtenus à partir de triple mutants sont mortes. Ces résultats suggèrent qu'à l'intérieur d'un biofilm l'oxygène est limitant et que les trois oxydases terminales cbb_3-1 , cbb_3-2 et CIO jouent un rôle crucial pour permettre aux cellules d'y survivre et s'y développer.

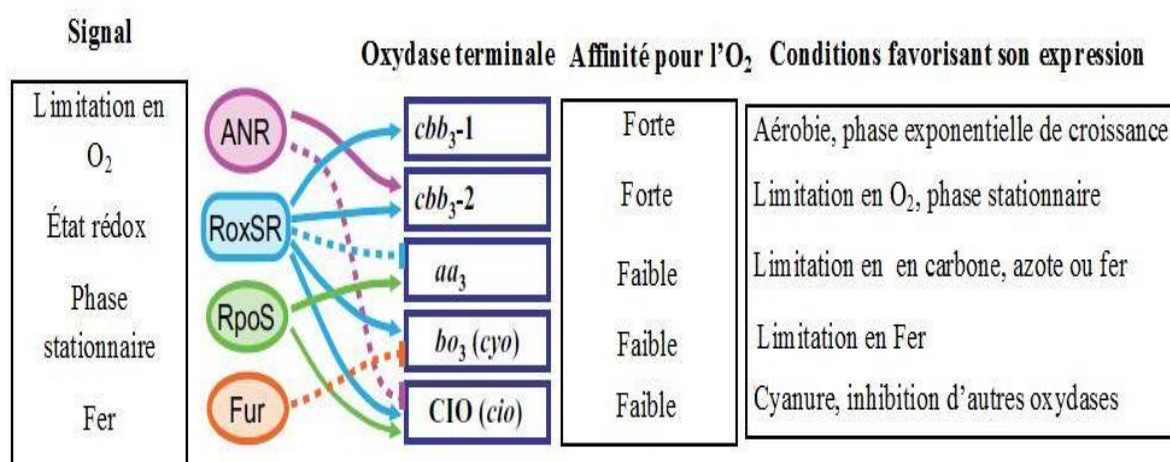


Figure 2 : Régulation de l'expression des oxydases terminales de *Pa*. Les flèches indiquent l'activation de l'expression de l'oxydase, les lignes pointillées terminées par une barre indiquent l'inhibition. Modifié d'après Arai (2011).

En anaérobiose, *Pa* peut se développer en utilisant les nitrates ou les nitrites comme accepteurs finaux d'électrons de sa chaîne d'oxydations phosphorylantes. Quatre étapes de réduction catalysées par quatre réductases permettent la transformation des nitrates en azote moléculaire.

Les étapes de la dénitrification sont schématisées comme suit :

Nitrate (NO_3^-) $\rightarrow$ Nitrite (NO_2^-) $\rightarrow$ Oxyde nitrique (NO) $\rightarrow$ Oxyde nitreux (N_2O) $\rightarrow$ Azote gazeux (N_2).

Chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique :

Une nitrate réductase membranaire (NAR). Cette enzyme est une quinol réductase terminale formant une boucle redox; elle prélève deux protons du cytoplasme et participe donc à la formation d'un gradient transmembranaire de protons. Une nitrate réductase périplasmique (NAP) est également présente chez *Pa* mais son rôle physiologique est encore incertain.

Une cytochrome cd_1 nitrite réductase (NIR) périplasmique. La réduction des nitrites requiert un complexe bc_1 fonctionnel; en effet ce dernier est requis pour le transfert des électrons du pool de quinones à la nitrite réductase via un cytochrome c_{551} (Arai et al., 1990).

Une cytochrome c oxyde nitrique réductase (NOR), protéine membranaire intégrale, qui sert de transporteur d'électrons lors d'une respiration anaérobie mais est aussi impliquée dans la détoxification de l'oxyde nitrique.

Et enfin, une cytochrome c oxyde nitreux réductase (N_2OR) périplasmique.

L'expression de la nitrite réductase et de l'oxyde nitrique réductase est sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels Anr et Dnr qui appartiennent à la famille des régulateurs Fnr, régulateurs sensibles à l'oxygène. Anr permettrait de détecter l'oxygène tandis que Dnr serait sensible à l'oxyde nitrique (NO).

Les gènes codant pour ces quatre réductases sont majoritairement exprimés en anaérobiose mais Alvarez-Ortega et Harwood, (2007) ont constaté qu'ils sont aussi exprimés en condition microaérophile.

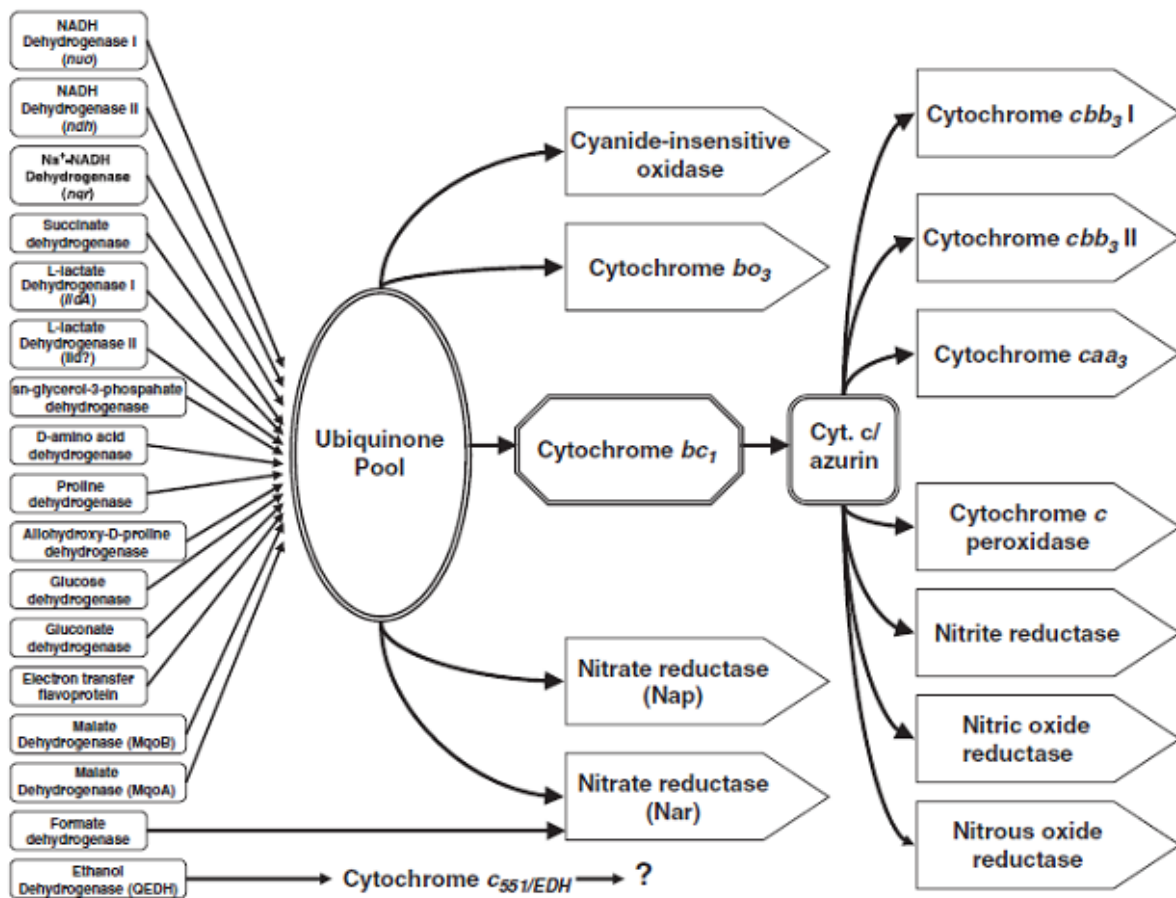


Figure 3: La chaîne respiratoire de *P. aeruginosa* (Williams et al., 2007).

3. Distribution environnementale et vie en biofilm

Pa est une bactérie ubiquitaire, largement répandue dans l'environnement. Elle se développe dans les sols, sur les végétaux (plantes, légumes, fruits, et fleurs), dans les eaux douces et marines, les eaux stagnantes (eaux thermales, piscines, égouts), et peut survivre dans les eaux minérales ou déminéralisées.

Chez l'homme, *Pa* peut exister à l'état commensal, avec une prédilection pour les zones humides : le tube digestif (en quantités peu abondantes chez le sujet sain), l'oropharynx, le nez et les oreilles, le tractus génital, les plis axillaires.

Pa est capable de vivre soit à l'état planctonique soit à l'état sessile fixé à un support (biofilm).

Sous forme planctonique, la bactérie se déplace de manière isolée grâce à son flagelle mais dans l'environnement, les bactéries vivent généralement en biofilm.

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice constituée de substances polymériques extracellulaires (EPS).

La formation et le développement du biofilm dépend de signaux environnementaux et bactériens dont ceux du quorum sensing (**Figure 4**). La première étape consiste en l'attachement initial de la bactérie à la surface d'une muqueuse ou d'un matériel inorganique (Davies et al., 1998). Les bactéries forment alors des microcolonies. Lors d'une seconde étape elles synthétisent des polymères dont elles s'entourent pour se protéger. L'adhésion devient alors irréversible et les microcolonies se structurent. La distribution des cellules bactériennes devient hétérogène au sein du biofilm. Le biofilm se développe et adopte une structure en forme de champignon, d'une épaisseur maximale de 100 µm. Les cellules se détachent de cette structure et se dispersent pour reformer un nouveau biofilm.

La structure de biofilm de *Pa* est maintenue par une matrice (Costerton et al., 1999) composée majoritairement d'un mélange comprenant en proportions variables selon la souche considérée des alginates, des polyoses encore imparfaitement caractérisés, de l'ADN ainsi que des protéines et des rhamnolipides.

La structuration du biofilm peut être encore plus complexe lorsqu'il comprend d'autres espèces en plus de *Pa*. Rudkjøbing et al. (2011) ont cependant montré que même lorsque d'autres bactéries telles que *H. influenzae* ou *S. aureus* sont présentes simultanément avec *Pa* dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose, les micro-colonies sont formées d'agrégats mono-espèce.

Un modèle artificiel de biofilm de *Pa*, réalisé dans des tubes capillaires, a permis de mettre en évidence que l'oxygène moléculaire (O₂) ne diffuse que dans la partie superficielle du biofilm (Werner et al., 2004). Ainsi, il a été montré que l'oxygène ne pénètre qu'à une

profondeur de 50 à 90 μm pour une structure de 250 μm , créant alors un gradient d'oxygène. Les cellules situées en surface présentent un métabolisme aérobie et seront dans une phase "active" de croissance alors que, les bactéries situées en profondeur devront adopter un métabolisme anaérobie.

De plus, la diffusion limitée des nutriments dans les zones les plus profondes du biofilm entraîne un ralentissement de la croissance comme celui observé au cours de la phase stationnaire (Walters et al., 2003).

L'ensemble des informations ci-dessus fait clairement apparaître que le biofilm est une structure hétérogène et évolutive et que les cellules de *Pa* incluses dans un biofilm (même mono-espèce) ne sont pas exposées au même micro-environnement.

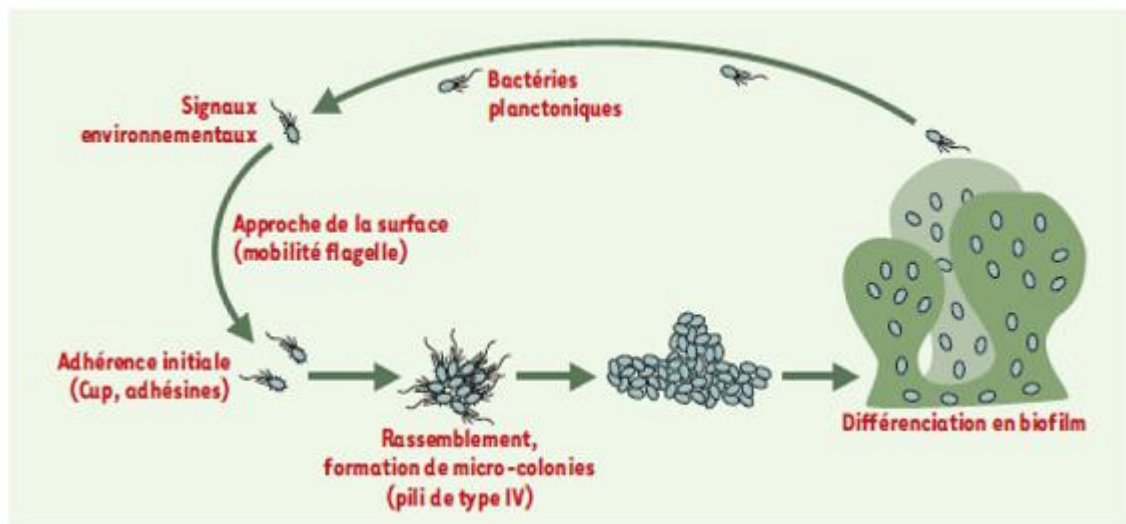


Figure 4 : Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux et Vallet, 2003).

4. Implications cliniques de *Pa*

Pa est un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes : humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (Rahme et al., 1995; D'Argenio et al., 2001; Pukatzki et al., 2002). 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. *Pa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (Lyczak et al., 2000; Bielecki et al., 2008; Branski et al., 2009).

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.

Cette bactérie est impliquée dans des infections nosocomiales (Vitkauskienė et al., 2010; Rosenthal et al., 2011). 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% du flux sanguin (Van Delden et Iglewski, 1998; Lyczak et al., 2000; Vitkauskienė et al., 2010).

En réponse à des signaux environnementaux, *Pa* est capable de provoquer une infection aiguë ou chronique. Deux senseurs LadS et RetS sont en particulier impliqués dans le contrôle de la virulence et la transition entre infection aiguë et chronique (Goodman et al., 2004; Ventre et al., 2006). Il a récemment été montré que la souche PA14 (un isolat clinique de *Pa*) porte une mutation dans le gène *ladS* (Lost Adherence Sensor) (Mikkelsen et al., 2011). Elle est donc affectée dans sa capacité à former un biofilm et présente une cytotoxicité accrue, associée à une forte augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la mise en place de la machinerie de sécrétion de type III et ceux codant les toxines injectés dans la cellule hôte. À l'inverse, un mutant affecté dans le gène *retS* possède une capacité augmentée à former des biofilms, la cytotoxicité du mutant *retS* est fortement diminuée (Goodman et al., 2004).

a. L'infection aiguë

L'infection aiguë, caractérisée par sa progression rapide et généralement considérée comme agressive, est associée à la production accrue de facteurs de virulence. Ces infections conduisent à des cas de septicémies sévères notamment chez les grands brûlés. Un autre type d'infection aiguë comprend la kératite (inflammation de la cornée) et l'ulcère de la cornée.

Enfin, cette bactérie est aussi capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif et des voies urinaires (Berthelot et al., 2005). Dans ce type d'infection *Pa* est considérée comme invasive et cytotoxique.

b. L'infection chronique

Les phénotypes de *Pa* associés aux infections chroniques sont caractérisés par un caractère mucoïde du à la surproduction des polyoses et notamment la surproduction d'alginate qui permettent la formation de biofilm, la perte de mobilité et la diminution de l'expression des facteurs de virulence (système de sécrétion de type III, protéases, pyocyanine et pyocheline) et modification du LPS (Hawdon et al., 2010; Bianconi et al., 2011). Dans ce type d'infection *Pa* est considérée comme non-invasive et non-cytotoxique. Il est intéressant de constater que les facteurs de virulence importants lors d'une infection aiguë semblent à l'inverse n'être que faiblement exprimés lors d'une infection chronique. Bianconi et al. (2011) ont suggéré que ce mécanisme permettait à *Pa* d'induire une moindre réponse inflammatoire ce qui lui permettrait d'échapper aux défenses de son hôte mais les résultats d'Hawdon et al. (2010) contredisent cette hypothèse. Ces auteurs ont comparé la capacité de souches de *Pa* isolées à partir de malades atteints de mucoviscidose à adhérer aux cellules épithéliales de poumon, à être internalisées et à induire une réponse inflammatoire. Ils ont constaté que les souches isolées à partir de malades infectés de manière chronique induisent une réponse inflammatoire plus importante.

c. Implication chez les patients atteints de mucoviscidose

Pa est aussi une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les patients atteints de mucoviscidose (Govan et Harris, 1986).

Cette maladie héréditaire autosomique récessive a pour origine la mutation d'une protéine membranaire, CFTR (Cystic Fibrosis Transconductance Regulator), qui joue un rôle dans la régulation des échanges ioniques des cellules avec le milieu extérieur. Sur le plan pulmonaire, l'absence ou le dysfonctionnement de cette protéine provoque un changement de la composition ionique et une diminution de l'hydratation du mucus bronchique. Ce mucus plus visqueux perturbe le phénomène de clairance ciliaire et constitue un terrain plus propice pour la colonisation bactérienne (Lyczak et al., 2002; Ratjen et Döring, 2003).

La colonisation des poumons a lieu dès l'enfance. Au stade précoce de la maladie, les principales bactéries retrouvées sont *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* et dans une moindre mesure *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Burkholderia cepacia*. Vers l'âge de 10 ans, *Pseudomonas aeruginosa* leur succède (Lenoir et al., 2007) et devient progressivement le seul contaminant présent dans le mucus lors des derniers stades de la maladie (Rudkjøbing et al., 2011).

Les patients atteints de mucoviscidose développent une infection pulmonaire chronique conduisant à une destruction des tissus pulmonaires par les 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, *Pa* 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 composé notamment d'alginate. Sous cette forme, *Pa* est plus résistante aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques. 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 de facteurs de virulence.

Aujourd'hui, à côté des thérapies consistant à diminuer l'inoculum bactérien par des cures d'antibiotiques répétitives, les traitements en développement s'orientent selon plusieurs 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 *Pa* ou par l'inhibition de l'activité de ces facteurs. De plus, des approches ciblant le Quorum Sensing (QS) pour limiter la primo-adhésion et la formation des biofilms sont soutenues par l'association Vaincre la mucoviscidose.

5. Facteurs de virulence

La virulence de *Pa* est liée à la production de nombreux facteurs de virulence associés à la bactérie et principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité, et de nombreux facteurs de virulence extracellulaires, correspondant aux toxines et protéases sécrétées (**Figure 5**).

De manière générale, la fonction des facteurs de virulence de *Pa* est de permettre le déplacement et l'adhésion de la bactérie puis conduire à la mort des cellules épithéliales des tissus qu'elle colonise.

Nous aborderons quelques facteurs de virulence, tout en sachant qu'ils ne constituent pas une liste exhaustive parmi des facteurs de virulence exprimés par *Pa*.

Outre le flagelle qui assure l'adhérence et la mobilité de type "swimming" (nage en milieu liquide) et "swarming" (nage en milieu semi-solide), *Pa* possède des pili responsables de l'adhérence et de la mobilité à la surface de milieux solides "twitching" et semi-solides "swarming". Les pili de type IV sont les plus anciennement connus. D'autres pili, semblables aux fimbriae que possède *E. coli* codés par un ensemble de gènes appelés *cupA*, *cupB*, *cupC* ont été mis en évidence (Vallet et al., 2001). Les lectines solubles de *Pa* LecA et LecB jouent également un rôle important dans l'adhésion

Parmi les substances sécrétées se trouvent aussi un grand nombre de toxines et d'enzymes de dégradation, notamment des protéases qui facilitent l'invasion des tissus. Ces toxines et enzymes sont sécrétées par trois machineries de sécrétion de type I (protéase alcaline, HasA, AprX), de type II (élastase, exotoxine A, phospholipase, phosphatase alcaline, protéine de liaison de la chitine) et de type III (exoenzymes S, T, U, V). Le système de sécrétion de type III est particulièrement important pour la virulence car il permet l'injection directe des toxines dans la cellule eucaryote, à la manière d'une seringue.

Des nombreux métabolites secondaires sont aussi impliqués dans la virulence de *Pa*. Parmi ces métabolites secondaires, nous pouvons citer :

les sidérophores, les rhamnolipides, la pyocyanine, le cyanure (HCN) et le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxyde (HQNO)...

- La pyocyanine (PYO)

La PYO est un pigment bleu-vert sécrété par la bactérie et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Lau et al., 2004 a). Comme elle fait l'objet de cette étude, elle sera décrite plus en détail dans le chapitre III.

- Le cyanure (HCN)

L'HCN est un inhibiteur des oxydases à hème-cuivre, composantes terminales des chaînes respiratoires de nombreux organismes. De plus, le HCN est un inhibiteur des métallo-enzymes dont font partie les enzymes de protection telles que la catalase, les peroxydases, les super-oxydes dismutases et les nitrates réductases (Schobert et Jahn, 2010).

Pa possède la CIO (cyanide-insensitive oxidase) et peut fermenter dans certaines conditions. L'HCN permet donc à *Pa* de concurrencer les autres bactéries quand la disponibilité en oxygène est limitée. Outre ce rôle dans la compétition bactérienne, l'HCN est primordial pour la virulence de *Pa*. Pour exemple, un mutant de *Pa* incapable de produire de l'HCN a été fortement affecté dans sa capacité à tuer le nématode *Caenorhabditis elegans*. La production d'HCN est catalysée par une flavoprotéine/déshydrogénase membranaire, l'HCN synthase, à partir de la glycine. Cette enzyme est codée par trois gènes structuraux *hcnA*,

hcnB, *hcnC*. Chez *Pa*, la synthèse d'HCN est contrôlée par le régulateur transcriptionnel sensible à l'oxygène appelé "Anaerobic Regulator" (ANR) ainsi que par le quorum sensing. Il n'est produit qu'en conditions microaérobie (Lenney et Gilchrist, 2011) lors de l'entrée en phase stationnaire et les souches mucoïdes en surproduisent (Schobert et Jahn, 2010). Le HCN peut atteindre *in vitro* des concentrations comprises entre 300 et 500 μM (Lenney et Gilchrist, 2011). Dans les crachats de malades atteints de mucoviscidose, cette concentration peut atteindre 200 μM . Ryall et al. (2008) ont mesuré des concentrations en cyanure pouvant atteindre 130 μM avec une moyenne de 72 μM chez des patients infectés par *Pa*.

- HQNO

Le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxyde (HQNO) est un analogue de l'ubiquinone et des ménaquinones. C'est un inhibiteur puissant du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire, mais aussi de certains quinol oxydases et quinol oxydo-réductase (Tokuda et Unemoto., 1984; Rich et al., 1990).

Lepine et al. (2003) ont constaté que la production de HQNO par *Pa* a lieu entre la fin de phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire. Ces auteurs ont mesuré des concentrations en HQNO pouvant atteindre $\sim 18 \text{ mg/l}$ ($\sim 69 \mu\text{M}$) dans le surnageant de culture de PA14 en phase stationnaire.

Avec d'autres poisons respiratoires, ce composé permet à *Pa* de lutter contre les bactéries compétitrices et plus particulièrement contre les bactéries Gram + telles que *S. aureus* ou *B. subtilis*. Sa présence induit la sélection de variants présentant le phénotype petites colonies chez *S. aureus* (Mitchell et al., 2010). Les bactéries Gram - (*E. coli* et *P. vulgaris*) y sont généralement résistantes (Lightbown et Jackson, 1956).

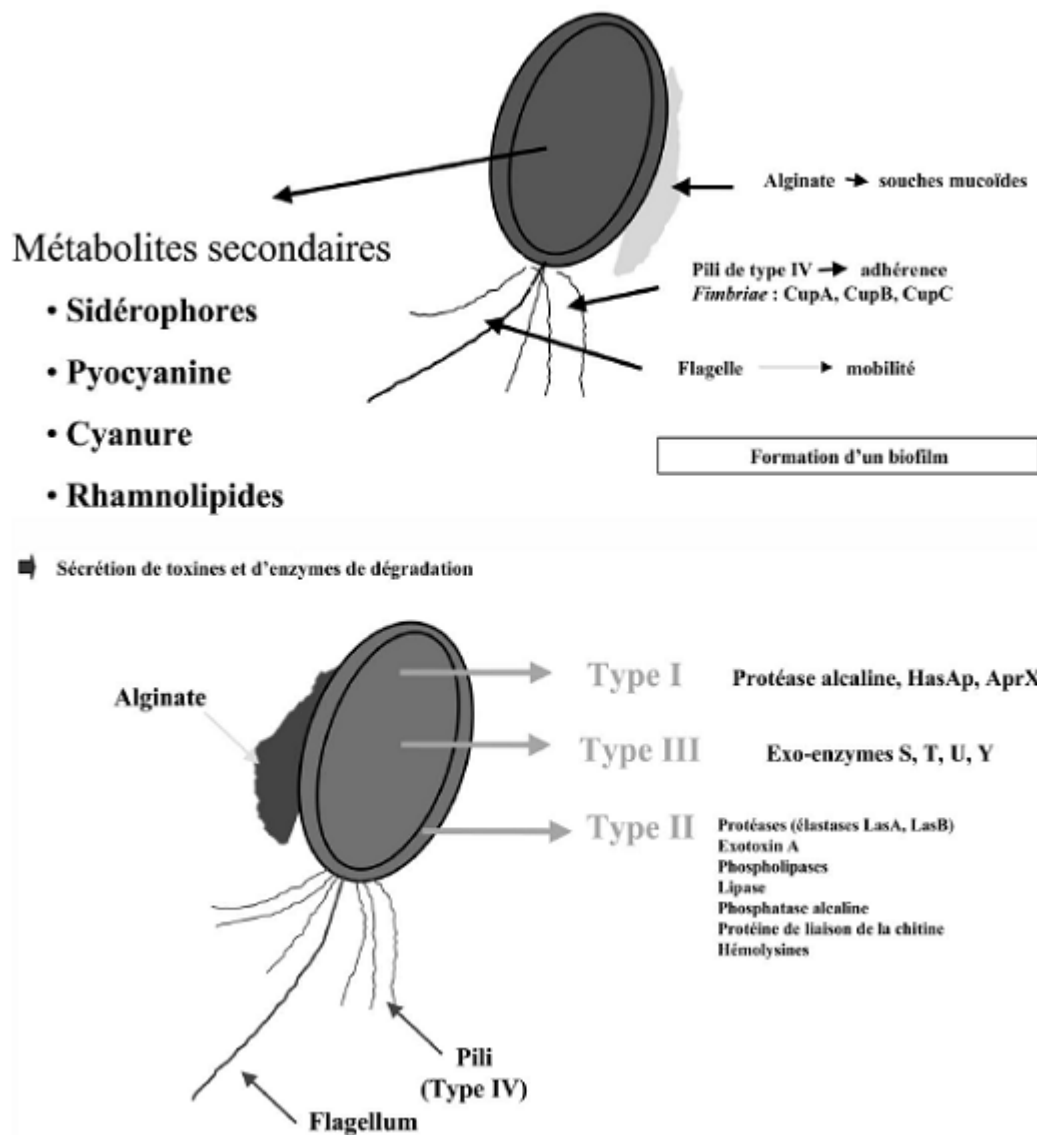


Figure 5: Représentation schématique des facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires de *P. aeruginosa* (Lazdunski, 2003).

6. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

La synthèse et la sécrétion de la plupart des facteurs de virulence est modulée en fonction du stade de croissance de la bactérie (phase exponentielle ou stationnaire), du mode de développement (planctonique ou biofilm) et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la bactérie.

Différents systèmes senseurs sont impliqués mais la machinerie du Quorum Sensing (QS) joue un rôle central dans le déclenchement de la virulence.

a. Quorum Sensing

Le quorum-sensing(QS) est un système de communication entre les bactéries qui leur permet de coordonner leur comportement. Il repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules appelées N-Acyl Homosérines Lactones (AHLs) ou autoinducteurs.

La concentration en AHLs augmente donc en fonction de la concentration cellulaire. Lorsqu'une certaine concentration est atteinte, ces molécules se fixent à des régulateurs transcriptionnels spécifiques qui vont activer la transcription des gènes régulés par ce système. La réponse est ainsi coordonnée au niveau de la population entière (Kaplan, 1985; Fuqua et al., 1994).

Chez *Pa*, deux systèmes effecteur/récepteur impliquant les AHLs coexistent, le système *las* et le système *rhI*, contrôlant à eux deux la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence. Chaque système a son propre régulateur transcriptionnel (*lasR* ou *rhIR*) ainsi que son auto-inducteur synthase (*lasI* ou *rhII*), une enzyme intervenant dans la synthèse d'AHL spécifique la N-(3-oxododécanyloyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) et la N-butyrylhomosérine lactone (C4-HSL) (**Figure 6**).

Le système «*las*» régule l'expression d'une variété de gènes cibles codant par exemple pour les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A (ToxA) ou la protéase alcaline. Il

permet aussi de réguler la mobilité bactérienne en induisant des mobilités de type "swimming" ou encore "twitching".

Le système Rh1 quant à lui est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes codant des facteurs de virulence : la pyocyanine, les rhamnolipides ou encore le cyanure.

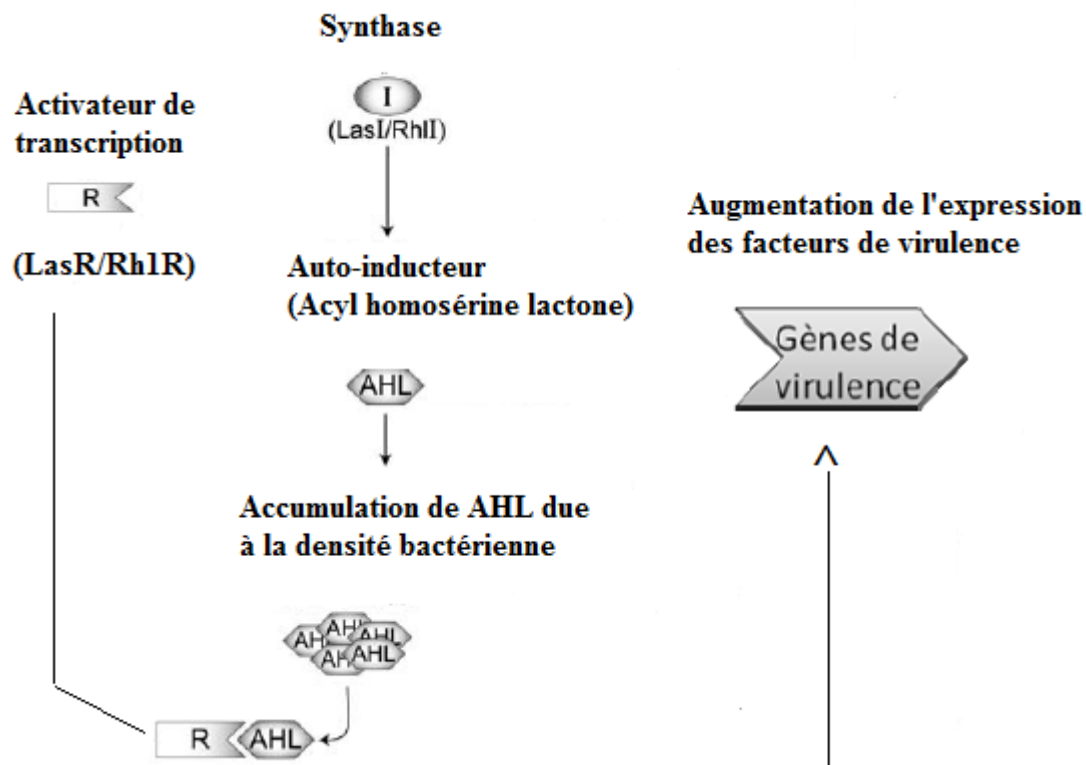


Figure 6 : Schéma simplifié du QS de *Pa* dépendant des N-AHLs (systèmes *las* et *rhl*) modifié de Kipnis et al. (2006).

En plus des AHL, *Pa* sécrète dans le milieu extracellulaire du 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone aussi appelé «*Pseudomonas* Quinolone Signal» (PQS) (Pesci et al., 1999). La synthèse et l'activité biologique de celui-ci ont été rapportées par la littérature comme étant liées aux systèmes *las* et *rhl*. Il a été proposé que LasR régule la production de PQS induisant ainsi l'expression de *lasB*, *rhII* et *rhlR* (Pesci et al., 1997; McKnight et al., 2000) et suggérant que l'activité dépendante du PQS constitue un lien de régulation important entre *las* et *rhl*. Toutefois, McKnight et al. (2000) ont suggéré que le PQS n'est pas impliqué dans

le contrôle de la densité cellulaire, mais plutôt dans le cycle de croissance, une caractéristique typique des molécules du QS.

Le PQS intervient dans la régulation de la production de phénazines donc de la pyocyanine. La formation du biofilm est également modulée par PQS.

Le QS représente une cascade de réponses organisées dans le temps. Les AHLs seraient libérées au cours des premiers stades de la phase exponentielle de croissance et induiraient la production de PQS en fin de la phase exponentielle de croissance, les facteurs de virulence étant libérés en début de phase stationnaire (Dietrich et al., 2006)

Les principales fonctions régulées par les systèmes QS et impliquées dans la pathologie de *Pa* sont présentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Fonctions régulées par le quorum sensing chez *P. aeruginosa* (modifié de Juhas et Tümmeler, 2005).

Contrôle par <i>las</i>	Contrôle par <i>rh1</i>	Contrôle par PQS
Synthèse de PQS	Synthèse de PQS	Système <i>rh1</i>
Système <i>rh1</i>	Rhamnolipides	Rhamnolipides
Formation de Biofilm		Formation de Biofilm
Protéase alcaline	Protéase alcaline	
Elastase	Elastase	Elastase
	Pyocyanine	Pyocyanine
Lipase	Lipase	
	Lectines A et B	Lectines A et B
Cyanure	Cyanure	
Exotoxine A		
Catalase		
Superoxyde dismutase		
Swimming		
	Exoenzyme S	

Malgré l'importance du quorum sensing dans la régulation de la virulence de *Pa* en général et la production de la PYO en particulier, des mutants *lasR* sont fréquemment isolés

des milieux hospitaliers ou environnementaux (Smith et al., 2006). Des analyses ont révélé que chez un mutant *lasR*, la quantité de PYO relarguée dans le surnageant après 24 h de culture était plus importante que dans les souches sauvages. Ce résultat est surprenant puisque le régulateur des gènes de biosynthèse de la PYO (*PHZ*) est *RH1R*, dont la transcription est sensée nécessiter la présence de *LasR* (Latifi et al., 1996; Pearson et al., 1997; Pesci et al., 1997; de Kievit et al., 2002). Cela pourrait remettre en cause les connaissances sur l'organisation hiérarchique du quorum sensing (Williams et Cámara, 2009).

Le fait que des mutants *lasR* soient fréquemment isolés lors d'infections pulmonaires chroniques pose aussi la question de l'importance du QS pour la pathogénicité de *Pa*. Certains auteurs ont suggéré que le QS serait important lors des premiers stades de l'infection, lors des phases aiguës, mais que son rôle diminuerait lors du passage à la chronicité (Heurlier et al., 2006; Winstanley et Fothergill, 2009). Certains auteurs ont même suggéré que ce mécanisme permettrait à *Pa* d'échapper aux défenses de son hôte; en effet une sécrétion moindre de facteurs de virulence lui permettrait d'induire une moindre réponse inflammatoire et assurerait la persistance de *Pa* (Carlsson et al., 2011). Il faut cependant remarquer que lors d'infections chroniques à *Pa* la population bactérienne évolue et finit par comprendre différents génotypes et phénotypes. La présence de mutants *LasR* pourrait simplement indiquer une adaptation de certaines souches et une coopération entre souches sauvages et mutants. Ce que Diggle et al. (2007), ainsi que Sandoz et al. (2007) ont décrit comme des bactéries «tricheuses» qui se servent du QS d'autres bactéries.

La persistance de souches surproductrices de facteurs de virulence parmi les souches de *Pa* est également en faveur de cette hypothèse. La souche dite de Liverpool est la souche la plus fréquemment isolée au Royaume Uni et est associée à une morbidité accrue (Fothergill et al., 2007). C'est une souche dite hypervirulente qui sécrète des intermédiaires du QS très rapidement lors de sa croissance et produit de grandes quantités de PYO et d'autres produits terminaux du QS. Compte tenu de la dépense énergétique que représente la production de ces facteurs sa persistance dans les communautés de *Pa* suggère que la surproduction de facteurs de virulence confère à ces souches un avantage compensant le poids que représente la production des facteurs de virulence. Il est aussi possible de penser

que l'avantage est collectif et que les bactéries QS-négatif profitent de l'hyperactivité des souches productrices ce qui conduit à leur persistance.

Les facteurs de virulence de *Pa* sont également produits en réponse à divers facteurs environnementaux. En effet, *Pa* a développé plusieurs mécanismes pour réagir aux différents stress environnementaux. Lors d'un stress, tel que la réponse immunitaire adaptative de l'hôte, une famille des protéines σ ECF (Extra-Cytoplasmic Factors) est à l'origine de la régulation positive des facteurs de virulence extra-cytoplasmique. La liaison du facteur σ ECF à l'ARN polymérase permet la reconnaissance de séquences promotrices de divers facteurs de virulence extra-cytoplasmiques permettant ainsi leur expression.

La protéine RpoS est un facteur σ ECF de *Pa*. L'expression de cette protéine est induite lorsque *Pa* entre dans la phase stationnaire (Fujita et al., 1994). RpoS module positivement ou négativement l'expression de 40% des gènes QS-dépendants (Schuster et al., 2004). Un mutant pour le gène *RpoS* montre une faible réponse aux stress environnementaux et il est incapable de produire la PYO et l'exotoxine A (Jørgensen, et al., 1999; Suh et al., 1999). Les résultats obtenus par l'équipe de (Whiteley et al., 2001) ont démontré que le facteur RpoS inhibe la transcription de *rh II* (quorum sensing) lorsque les cultures bactériennes sont en phase logarithmique précoce de croissance.

Chapitre II : Les phénazines et la pyocyanine

A. Les phénazines

1. Généralités

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées, capables d'une action antibiotique à large spectre et également toxiques pour les cellules eucaryotes. L'aptitude à les produire est limitée aux bactéries (*Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Nocardia* et *Brevibacterium*). Plus de 100 phénazines naturelles sont actuellement connues, toutes ayant le même noyau hétérocyclique. Certaines souches bactériennes peuvent produire jusqu'à 10 dérivés phénaziniques différents en même temps (Mavrodi et al., 1998; Delaney et al., 2001; Chin-A-Woeng et al., 2003).

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont différentes fonctions biologiques et participent notamment à la virulence de la bactérie (Mazzola et al., 1992; Mahajan-Miklos et al., 1999; Wang et al., 2010).

Pa produit 4 phénazines différentes : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine), la phénazine-1-carboxylique acide (PCA), la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ) et la phénazine-1- carboxamide (PCN).

2. Biosynthèse

La biosynthèse des phénazines débute avec l'acide shikimique, à partir duquel est synthétisé le chorismate, qui sera transformé en acide 2-amino-2-deoxyisochlorismique. Ce dernier pourra alors se dimériser pour former le premier composé de la famille, soit la phénazine-1- carboxylique acide (PCA). Les autres molécules comme la PYO, la phénazine-

1- carboxamide (PCN) et 1'-hydroxyphénazines (1-OHPHZ) dérivent du PCA (Price-Whelan et al., 2006) (**Figure 7**).

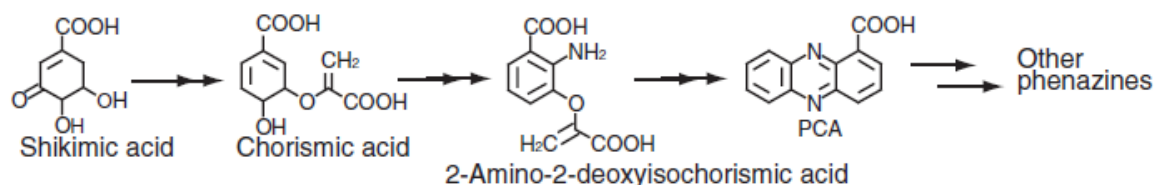


Figure 7 : Biosynthèse des phénazines (Price-Whelan et al., 2006).

Les gènes impliqués dans la synthèse des phénazines sont regroupés sur un même opéron et sont bien conservés entre *P. fluorescens* 2-79, *P. chlororaphis* PCL1391, *P. aeruginosa* PAO1-PA14 et *P. aureofaciens* 30-84. Dans chacun des cas, on trouve un opéron de sept gènes : *Phz A, B, C, D, E, F, G* dont la séquence de nucléotides montre une homologie de l'ordre de 70 à 95 % d'identité entre ces différentes espèces (Mavrodi et al., 1998; Delaney et al., 2001; Chin-A-Woeng, et al., 2003).

De plus, chez *Pa*, le génome contient 2 opérons : *phzA1, B1, C1, D1, E1, F1, G1* et *phzA2, B2, C2, D2, E2, F2, G2* distants de 2,6 Mb et dont la séquence est identique à 98,3%. Chacun de ces deux opérons est suffisant pour la production de PCA (Mavrodi et al., 1998). Les différentes espèces de *Pseudomonas* partagent donc des gènes de production de phénazines assez semblables mais elles se démarquent par l'éventail des phénazines qu'elles produisent (**Figure 8**).

En effet, chez certaines espèces, d'autres enzymes peuvent intervenir pour former différents dérivés à partir du PCA. C'est le cas de *P. chlororaphis* PCL1391 où le gène *phzO* catalyse la conversion du PCA en acide 2-hydroxyphénazine (2-OH-PCA) (Delaney et al., 2001).

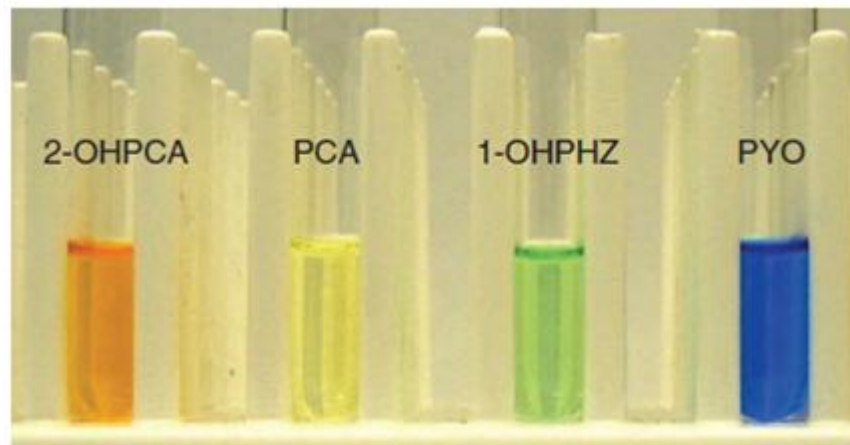


Figure 8 : Phénazines produites par les différentes espèces de *Pseudomonas*. Avec 2-OHPCA : 2-hydroxyphénazine; PCA : phénazine-1-carboxylique acide; 1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine; PYO : pyocyanine (Price-Whelan et al., 2006).

Chez *Pa*, deux gènes *phzM*, *phzS* sont impliqués dans la production de PYO à partir de PCA (Mavrodi et al., 2001). *phzS* est également impliqué dans la production de 1-hydroxyphénazine, et le gène *phzH* dans la production de phénazine-1-carboxamide (PCN) (Figure 9).

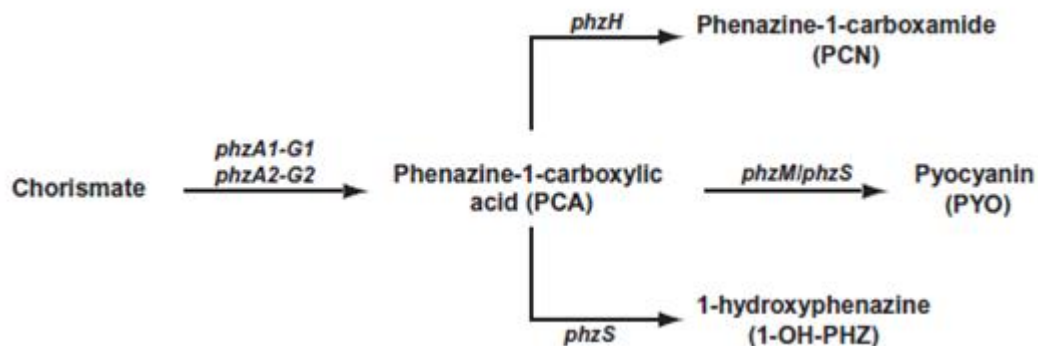


Figure 9 : Ensembles des gènes impliqués dans la biosynthèse des phénazines chez *Pa* (Dietrich et al., 2006).

3. Rôle chez les bactéries productrices

Les premières études sur le rôle des phénazines produites par les bactéries suggéraient une implication dans la survie des microorganismes dans le sol. Cependant, certains auteurs se questionnaient sur la synthèse de ces composés au niveau du sol, étant donné la faible quantité de nutriments, spécialement de composés carbonés, présents dans cet environnement.

Le doute a été dissipé suite à l'extraction de PCA directement à partir de racines de blé colonisées par *P. fluorescens* 2-79 ou *P. aureofaciens* 30-84 (Mazzola et al., 1992).

De plus, le rôle écologique des phénazines a été mis en lumière par l'utilisation de mutants déficients dans la production d'antibiotiques. En effet, la perte de l'aptitude à produire des phénazines se traduit par une réduction marquée de l'aptitude à coloniser la rhizosphère du blé et à survivre dans le sol en compétition avec la communauté microbienne. Cette capacité de colonisation et de survie est restaurée et égale à celle des souches parentales, par la complémentation génétique des mutants (Mazzola et al., 1992). L'avantage de la production des phénazines pour la colonisation et la survie dans la rhizosphère a également été démontré en comparant le comportement des souches parentales et des souches mutantes dans des sols naturels et des sols stérilisés. Dans le sol stérilisé, où la compétition pour l'espace et les nutriments est nulle, les mutants *phz* - pouvaient coloniser la rhizosphère du blé aussi bien que les souches *phz* +. Par contre, dans le sol naturel à forte compétition microbienne, les souches *phz* - étaient largement déclassées par leurs homologues parentaux.

L'implication des phénazines dans la compétition écologique se traduit également par une action directe sur le biocontrôle des pathogènes racinaires fongiques (Cook et al., 1995; Chin-A-Woeng et al., 2003). Il a ainsi été montré que les phénazines permettent d'inhiber la croissance de champignons phytopathogènes tels que *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium oxysporum* (responsable de la pourriture des racines de tomate), *rhizoctonia solani*, *Gibberella avenacea* ou *Drechslera graminea* (Mavrodi et al., 2006). Il a également été constaté que les malades atteints de mucoviscidose sont peu sujets aux développements de candidoses alors même que *C. albicans* est présente dans leur microflore

et qu'ils sont soumis à des traitements antibiotiques qui seraient susceptibles de favoriser ce type de pathologie. Cette propriété a été reliée aux propriétés antifongiques des phénazines produites par *Pa*.

D'autres études suggèrent que les phénazines pourraient avoir d'autres fonctions en plus de leur rôle écologique.

Les phénazines pourraient modifier la disponibilité du fer présent dans le milieu. En effet, les phénazines excrétées dans le milieu pourraient réduire le fer et le rendre plus disponible. Il a été montré que *Pseudomonas chlororaphis* peut solubiliser des cristaux d'oxyde de fer via une phénazine (la 1-carboxyamide phénazine) (Hernandez et al., 2004). Des mutants de *Pa* incapables de produire le sidérophore pyoverdine peuvent néanmoins se développer en biofilm en présence de PCA (Wang et al., 2011). Cette propriété serait due au fait que la PCA permet de réduire le fer ferrique en fer ferreux, le rendant ainsi plus disponible.

Wang et Newman (2008) ont ainsi montré que la PYO, la phénazine-1-carboxylique acide (PCA), la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ) et la phénazine-1-carboxamide (PCN) peuvent dissoudre des cristaux de ferrihydrite et d'hématite. Ces auteurs ont également montré que les phénazines peuvent réduire l'hydroxyde ferrique et que cette réaction est inhibée par l'O₂.

Les phénazines pourraient servir de navette pour le transport des électrons. Les microorganismes producteurs de phénazines s'en serviraient comme accepteur d'électrons permettant de maintenir leur balance redox en l'absence d'accepteur d'électron tel que l'oxygène (Wang et al., 2010).

Des études récentes suggèrent que les phénazines pourraient avoir une influence sur l'adhésion et la structuration des biofilms (Maddula et al., 2008; Ramos et al., 2010). Bien que très peu de travaux aient été publiés dans ce domaine, une étude a montré qu'une peinture contenant du surnageant de culture d'une souche marine de *Pseudomonas* présentait une activité antibactérienne et antifouling (Burgess et al., 2003). A l'inverse, il a été mis en évidence que la 2-hydroxy-1-carboxy-Phénazine (2-OHPCA) faciliterait l'adhésion cellulaire

chez *P. chlororaphis* 30-84 (Maddula et al., 2008); la concentration en 2-OHPCA ainsi que la présence d'autres phénazines module la vitesse de formation du biofilm, son uniformité et son épaisseur. Enfin, des mutants de *P. chlororaphis* 30-84 incapables de sécréter des phénazines sont également incapables de former des biofilms.

Il est intéressant de noter que lorsqu'une bactérie produit plusieurs types de phénazines, chacune de ces phénazines pourrait jouer un rôle spécifique. Il est par exemple possible de moduler les propriétés d'adhésion et l'aptitude au développement en biofilm en modulant le ratio des différentes phénazines produites (Maddula et al., 2008; Pierson et pierson, 2010). Des mutants de *P. chlororaphis* 30-84 surproducteurs de 2OHPCA adhèrent plus rapidement et uniformément que la souche sauvage ou la souche ne produisant uniquement le PCA. Des souches ne produisant que le PCA permettent d'obtenir des biofilms plus épais que la souche sauvage ou le mutant surproducteur de 2-OHPCA. Chez *P. chlororaphis* 30-84 la 2-OHPCA serait donc principalement impliquée dans l'adhésion cellulaire, alors que le PCA favoriserait la croissance en servant de navette pour le transfert d'électrons. Ces résultats suggèrent que les bactéries pourraient produire différentes phénazines à des concentrations spécifiques en fonction de leur rôle pour la communauté bactérienne (Pierson et Pierson, 2010). De façon similaire, Wang et al. (2011) ont suggéré que le PCA produit par *Pa* lui permet de solubiliser le fer et ainsi l'assimiler rendant le développement en biofilm possible alors que la PYO favoriserait aussi le développement en biofilm mais par un autre mécanisme.

B. La pyocyanine (PYO)

Le principal pigment phénazinique produit par *Pa* est la pyocyanine. La pyocyanine est également la phénazine la plus étudiée. Ce métabolite secondaire est retrouvé en large quantité : jusqu'à 27,3 µg/ml (~ 130 µM) dans les mucus de patients atteints de mucoviscidose présentant une infection chronique à *Pa* (Wilson et al., 1988).

Chimiquement, la PYO est la N-méthyl-1-hydroxyphénazine, elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans le chloroforme et dans les solvants organiques (Méthanol, Ethanol...). En solution aqueuse, la PYO présente la propriété de changer de couleur en fonction du pH et de son état d'oxydation: la PYO oxydée est rouge en milieu acide (pH < 4,9) et bleue en milieu neutre et alcalin (**Figure 10**). La PYO réduite ou leucopyocyanine est incolore.

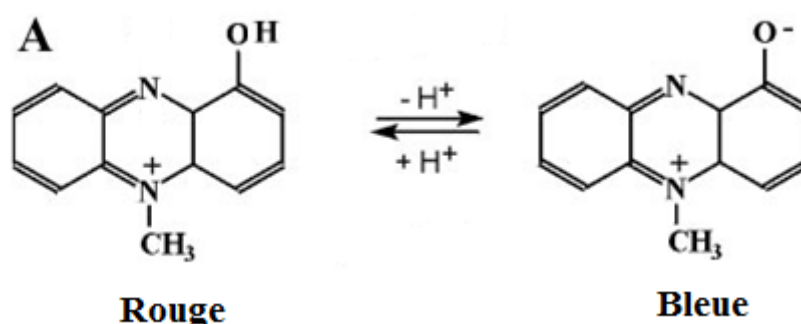


Figure 10 : Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique modifié d'O'Malley et al. (2004).

1. Importance de la PYO pour la pathogénicité de *P. aeruginosa*

De récentes études menées *in vivo* sur plusieurs modèles tels que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ou encore des souris, ont révélé que la PYO joue un rôle crucial dans l'infection par *Pa* (Mahajan-Miklos et al., 1999; Lau et al., 2003; Lau et al., 2004 b).

En 2004, Lau et al. ont montré que la PYO est importante pour la virulence de *Pa* lors d'une infection aiguë des poumons. Ces auteurs ont utilisé un modèle murin et comparé la sévérité de lésions pulmonaires induites par les souches PA14 et PAO1 ou de mutants non producteurs de PYO lors d'une infection aiguë. Ils ont montré que les souches productrices de PYO induisent des lésions plus sévères. De plus les souris infectées par les souches mutantes étaient capables de se débarrasser de la charge bactérienne alors que les souches PA14 et PAO1 se développaient et leur concentration était multipliée par dix pendant le même temps. De plus, l'apport exogène de PYO à des souches incapables de la produire restaurait leur virulence. Enfin cette même équipe a constaté que l'instillation de PYO dans les poumons de souris induisait une pneumonie sévère avec afflux de neutrophiles alors que l'instillation d'un surnageant de culture de mutant incapable de produire la PYO ne produisait pas cette réponse. A partir de ces résultats, Lau et al. ont conclu que la PYO est un important facteur de virulence pour *Pa* lors d'infection aiguë des poumons. Des études précédentes avaient montré que la PYO est un facteur de virulence important pour *Pa* lors de l'infection de brûlures (Mahajan-Miklos et al., 1999; Cao et al., 2001).

De plus Lau et al. (2004) ont mis en évidence que l'instillation répétée de PYO dans les poumons de souris induit des dommages similaires à ceux observés lors d'infections à *Pa*.

Caldwell et al. (2009) ont mis en évidence que la PYO est importante lors d'une infection pulmonaire chronique par *Pa*. L'instillation régulière de faibles doses de PYO dans les poumons de souris durant plusieurs semaines induit les traits caractéristiques d'une infection à *Pa*. Ce composé serait donc essentiel pour la pathogénicité chronique de *Pa*.

Cependant, d'autres études remettent en cause son importance.

Prenons tout d'abord l'exemple d'une étude récente sur les anomalies immunologiques et la présence d'anticorps anti-neutrophiles (ANCA) dans la mucoviscidose. Les ANCA sont des anticorps qui reconnaissent des antigènes présents dans les granulations des polynucléaires neutrophiles. Les principaux antigènes cibles sont la protéinase 3 (PR3) (Jenne et al., 1990), et la myéloperoxydase (MPO) (Falk et Jennette, 1988). D'autres cibles comme la bactericidal/permeability increasing protein (BPI) ont aussi été décrites. Carlsson et al. (2011) ont montré que la présence de BPI-ANCA est corrélée avec une colonisation chronique par *Pa*, l'importance du syndrome inflammatoire et la gravité de l'atteinte fonctionnelle respiratoire. Les patients BPI-ANCA positifs sont colonisés par des souches de *Pa* qui ne produisent pas la PYO et ont un mauvais pronostic, tandis que les patients BPI-ANCA négative sont colonisés par des souches de *Pa* qui produisent la PYO et ces patients présentent un état clinique stable (Carlsson et al., 2011).

De plus, les souches pulmonaires de *Pa* isolées au cours de la mucoviscidose ont souvent tendance à acquérir des phénotypes particuliers qui ne sont pas communs dans l'environnement. Ces souches sont fréquemment mucoïdes (surproduction d'alginate, mutation du gène *mucA*), alors que les souches mucoïdes de *Pa* sont extrêmement rares dans la nature. La majorité des souches mucoïdes ne sont pas pigmentées. Cette absence de pigment serait due à une inhibition de la pigmentogénèse par la substance mucoïdes (Elston, et Hoffman, 1967; Mahenthiralingam et al., 1996; Spilker et al., 2004). En moyenne 60-70% de bacilles pyocyaniques isolés de patients atteints de mucoviscidose sont mucoïdes contre 2% de souches mucoïdes en dehors de la mucoviscidose. La corrélation entre la forme mucoïde de *Pa* et les infections chroniques pulmonaires chez les patients souffrant de mucoviscidose est maintenant bien établie, et est reconnue comme la cause majeure de mortalité chez ces individus.

Les données bibliographiques sont donc contradictoires quant à l'importance de la PYO pour la pathogénicité chronique de *Pa*. L'explication de cette disparité pourrait provenir du fait que le mucus bronchique des patients atteints de mucoviscidose favorise la diversification phénotypique de *Pa*, comme les études menées par Sriramulu et al. (2005) le suggèrent et qu'il pourrait exister une coopération entre souches sauvages et mutants, comme

l'ont proposé Diggle et al. (2007) ainsi que Sandoz et al. (2007) certaines bactéries bénéficiant des effets de la PYO produite par d'autres.

2. La PYO génératrice de stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre de la balance redox résultant d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et/ou d'une diminution des défenses anti-oxydantes.

La toxicité de la PYO pourrait être due à sa capacité à induire un stress oxydatif (Hassan et Fridovich, 1980; O'Malley et al., 2004; Muller, 2006; Gloyne et al., 2011). En effet, la PYO est une molécule redox active, elle a donc tendance à capter des électrons (1 ou 2 électrons). Au cours de son recyclage redox (**Figure 11**), la forme réduite de la PYO céderait un électron à l' O_2 et induirait ainsi la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et, par dismutation, de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

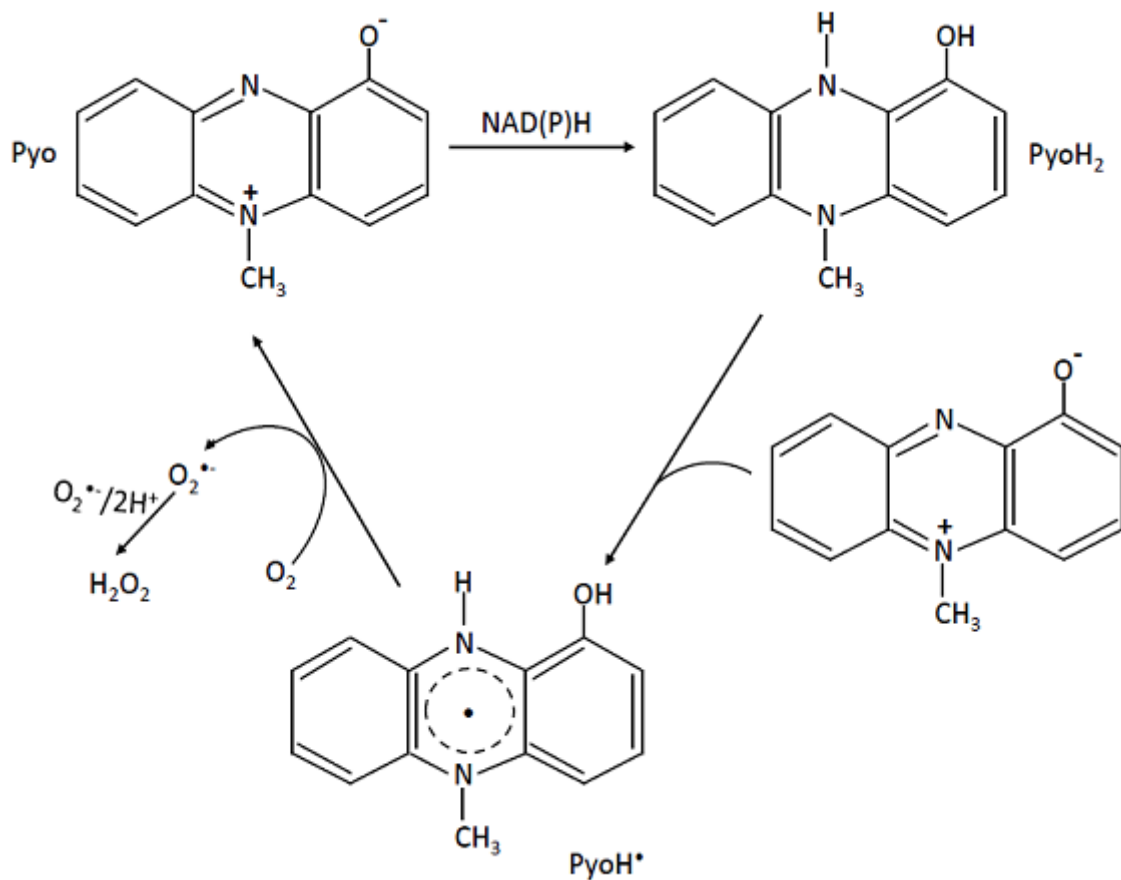


Figure 11: Mécanisme de réduction de la PYO et production de ROS (Reszka et al., 2004).

a. Activation de la PYO par les agents réducteurs

Le potentiel Redox de la PYO (-34 mv à pH7,0) (Friedheim et Michaelis, 1931) favorise sa réduction non enzymatique par des nombreux agents réducteurs, et plus particulièrement le NADH et le NADPH.

Britigan et al. (1992) ont montré que le NADH peut réduire la PYO *in vitro*, que l'oxygène soit présent ou non et conduire à la formation de PYO radical en anaérobiose, et d'anion superoxyde en aérobiose.

Müller et al. (1989) ont clairement mis en évidence que le NADPH peut réduire la PYO non-enzymatiquement; ces résultats ont été confirmés par la suite par Muller en 2011.

Reszka et al. (2004) ont suggéré que la PYO peut subir une réduction à deux électrons par le NAD(P)H, et être réduite en une molécule incolore (PYOH₂: leucopyocyanine). La leucopyocyanine peut alors réagir avec une autre molécule de PYO pour former le PYO radical (PYOH·: PYO réduite à un seul électron) selon le modèle déjà présenté **Figure 11**.

La PYO pourrait également être réduite par le glutathion, mais ce mécanisme est contesté.

En effet, O'Malley et al. (2004) ont observé que l'incubation de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE) en présence de PYO provoque une chute importante ($\approx 50\%$) du taux de GSH (glutathion réduit) et une augmentation du taux de GSSG (glutathion oxydé), et que la surexpression de la catalase protège partiellement de cet effet.

Par résonance paramagnétique électronique (EPR), ils ont montré que la PYO oxyde directement le glutathion et conduit à la formation de PYO radical et d'anion superoxyde (O₂^{•-}). Ces auteurs ont conclu que le glutathion considéré comme le principal antioxydant cellulaire ne protège pas les cellules de la toxicité de la PYO mais au contraire l'induit.

Cependant une étude récente contredit ces résultats. Muller (2011) a mis en évidence que la PYO peut être réduite *in vitro* par le NADPH mais pas par le glutathion. De plus, il a montré que l'ajout du glutathion exogène protège les fibroblastes de derme humain (HDF) de la sénescence provoquée par une concentration subcytotoxique de PYO. Il en a conclu que le glutathion participe à la détoxification cellulaire. Il protégerait de l'effet toxique de la PYO en permettant la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau selon une réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX) (**Figure 12**).

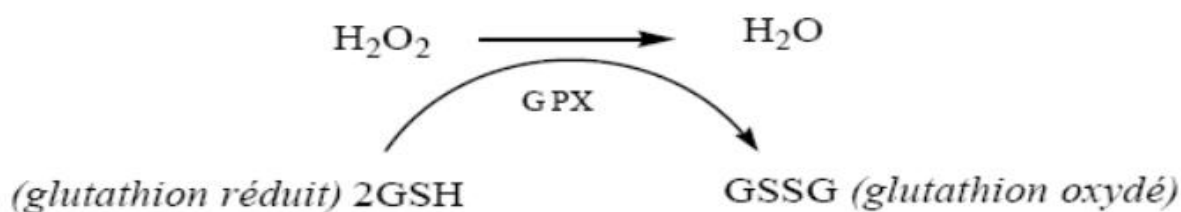


Figure 12: Elimination du H_2O_2 par la glutathion peroxydase (GPX).

Muller (2002) a suggéré que la PYO participerait à la déplétion des cellules endothéliales humaines en GSH *via* la génération de stress oxydatif et surtout *via* la formation d' H_2O_2 à l'extérieur de la cellule. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'ajout de catalase exogène empêche la perte de GSH et protège les cellules du stress oxydatif généré par la PYO.

De même, Muller (2006) a expliqué la sénescence des cellules épithéliales de poumon (A549) en présence de faibles concentrations (5-10 μM) de PYO par la production accrue de ROS (H_2O_2 , et $\text{O}_2^{\cdot-}$) et il a montré que l'ajout du glutathion exogène protège les cellules (contre la sénescence provoquée par la PYO).

De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse du recyclage redox de la PYO pour expliquer son mécanisme de toxicité et son rôle potentiel dans l'induction d'un stress oxydatif.

b. Toxicité de la PYO envers les cellules bactériennes (stress oxydatif)

L'effet bactéricide de la PYO pourrait ainsi être expliqué par sa capacité à induire un stress oxydatif. Hassan et Fridovich (1980) ont observé qu'*Escherichia coli* est sensible à la PYO lorsqu'elle est cultivée en milieu minimum, et qu'elle l'est nettement moins lorsque le milieu est enrichi en extrait de levures. Ils ont constaté que l'ajout de PYO dans le milieu enrichi induit l'expression des enzymes antioxydantes, la catalase et dans une moindre mesure la superoxyde dismutase (SOD), et que l'ajout de SOD et de catalase exogène protège les cellules de la toxicité de PYO. Ces auteurs ont donc suggéré que la PYO génère de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et par dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'extérieur de la

cellule, puis qu'une partie d' H_2O_2 traverse la membrane cellulaire et induit l'expression de catalase.

Hassan et Fridovich ont aussi constaté qu'*Escherichia coli* est beaucoup plus sensible à la PYO en présence d'oxygène (aérobie) qu'en anaérobiose. Par l'utilisation d'électrode de Clark, ils ont montré que la PYO provoque une reprise de la consommation d' O_2 en présence de cyanure (KCN). A partir de l'ensemble de ces résultats ils en ont conclu que la toxicité de la PYO dépend de la présence d' O_2 . Elle est due à la production accrue d' H_2O_2 et d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (stress oxydatif).

c. L'effet de la PYO et de ses précurseurs sur les levures

L'effet toxique de la PYO et de ses précurseurs sur *Candida albicans* (*C. albicans*) a fait l'objet de plusieurs études.

En effet, plusieurs études cliniques ont mentionné la limitation de croissance de *C. albicans* par *Pa*. De plus, un traitement antibiotique ciblant *Pa* a pour conséquence une prolifération de *C. albicans* (Kerr, 1994; Burns et al., 1999).

Des études préliminaires ont permis de mettre en évidence *in vitro* l'effet négatif exercé par certains facteurs de virulence tels que la PYO et la 1-hydroxyphénazine sur la croissance de *C. albicans* (Kerr, 1994; Kerr, et al., 1999). La première étude (Hogan et Kolter, 2002) a clarifié les conditions dans lesquelles *Pa* et *C. albicans* interagissent : l'interaction de *Pa* avec *C. albicans* se déroule lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance et que les champignons sont sous forme filamenteuse. Elle aboutit au terme de 72 h de coculture à l'agglutination d'un conglomérat bactérien autour de filament puis à la formation d'un biofilm autour des colonies bactériennes entraînant la mort du champignon.

L'utilisation des souches mutées sur les gènes de synthèse des phénazines et de la PYO s'est traduit par une réduction marquée de l'activité fongicide de *Pa* (Mahajan-Miklos et al., 1999).

Gibson et al., 2009, puis Morales et al., 2010 ont observé que l'interaction directe entre *C. albicans* et *Pa* conduit à la formation d'un pigment rouge autour de *C. albicans* et à

la limitation de sa croissance. Le pigment rouge a été identifié comme un précurseur instable de la PYO : la 5-méthyl-phenazinium-1-carboxylate (5MPCA) (**Figure 13 A**). Le 5MPCA est peu étudié car il est très instable et il ne s'accumule pas dans les surnageants de culture. L'équipe de Gibson et Morales ont constaté que la 5MPCA et la phénazine méthosulfate (PMS) possèdent une structure semblable (**Figure 13 B**) et compte-tenu de l'instabilité de la 5MPCA, ils ont étudié l'effet de PMS sur la croissance de *C. albicans*.

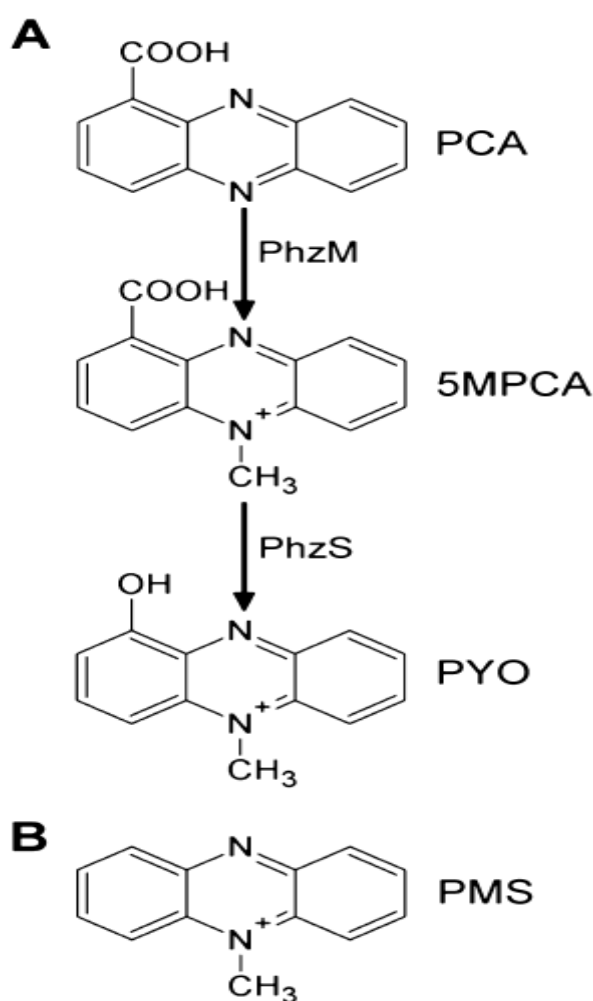


Figure 13: A) Formule développée de PYO et de ses précurseurs (PCA et 5MPCA).

B) Formule développée de phénazine méthosulfate (PMS).

(Morales et al., 2010).

Ils ont alors suggéré le mécanisme suivant (**Figure 14**) pour expliquer la toxicité de 5-MPCA ou PMS envers *C. albicans*:

En présence de *C. albicans*, *Pa* sécrète la 5MPCA qui est réduite par des réducteurs extracellulaires. La 5MPCA réduite pénètre dans la cellule de *C. albicans*, elle est oxydée par l' O_2 et provoque la production de ROS. Ainsi, la 5MPCA peut réagir directement avec des macromolécules cellulaires de *C. albicans* (par ex : de protéines...) et provoque l'accumulation des dérivés méthylphenazinium (dérivées de couleur rouge) très toxiques pour la cellule.

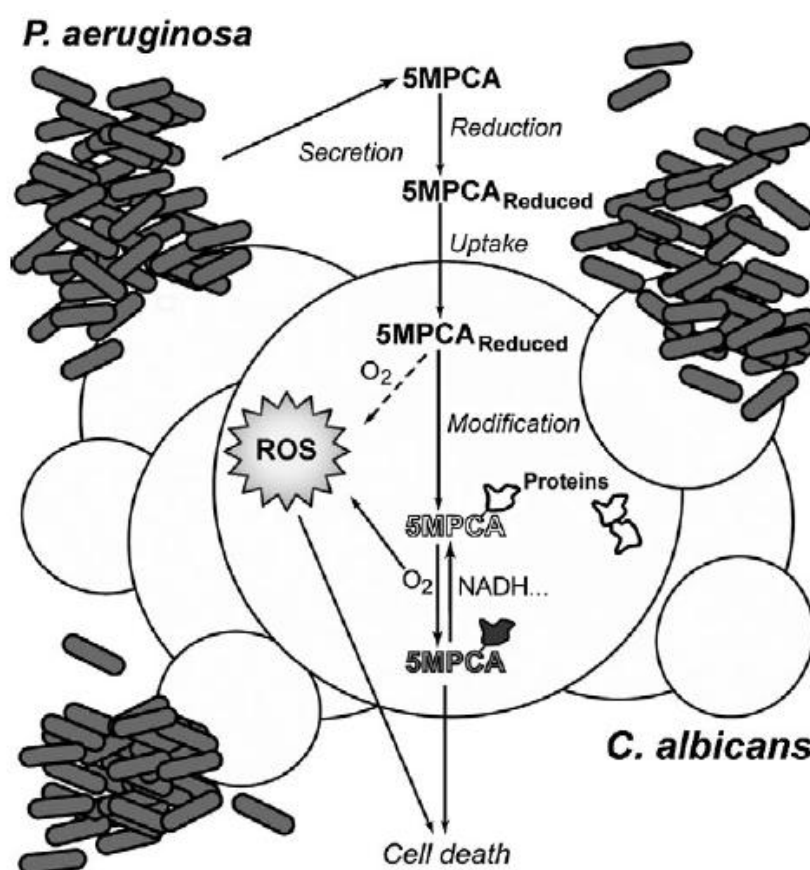


Figure 14: Le mécanisme de toxicité de 5MPCA envers *C. albicans*, d'après Morales et al. (2010).

Plusieurs études ont concerné l'effet de la PYO et ses dérivés sur *C. albicans* mais il existe peu de travaux concernant d'autres levures.

Récemment, l'étude de Rella, et al. (2012) a permis de mettre en évidence l'effet négatif exercé par la PYO et les quinolones (PQS) sur la croissance de *Cryptococcus neoformans*. En effet, l'utilisation de mutants affectés dans la production des quinolones et surtout défectifs dans la production de PYO entraîne une baisse de la mortalité de *Cryptococcus neoformans*, co-cultivé avec *Pa*.

Une seule étude a examiné la sensibilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à la PYO. Cette étude a été réalisée sur une large collection de mutants de levure *S. cerevisiae* (Ran et al., 2003) dans le but d'identifier des nouvelles cibles cellulaires de la PYO. Ces auteurs ont utilisé *S. cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote car certains gènes levuriens ont un fort degré d'homologie avec des gènes de cellules eucaryotes supérieurs, tant en terme de séquence qu'en terme de fonction dans la cellule. A partir d'un très grand nombre de mutants, ils ont déterminé quelles mutations induisent une sensibilité accrue vis-à-vis de la PYO ou au contraire une résistance et en ont déduit quelles pourraient être les cibles de la PYO.

Ran et al. ont expliqué les effets de la PYO par l'inactivation des ATPases de type V via le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (stress oxydatif). La V-ATPase est associée à la membrane de nombreux organites des cellules eucaryotes. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, le trafic protéique, l'osomrégulation, et des processus sécrétoires divers. Ran et al. ont aussi suggéré que la PYO affecte d'autres processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, les transferts d'électrons et la respiration.

Cependant, tous les mutants de *S. cerevisiae* utilisées dans l'étude de Ran et al. sont issus de la souche BY4741, souche affectée dans sa respiration. En effet, la souche BY porte une mutation (insertion Ty) dans le gène *hap1* codant pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation complexe de l'expression des gènes en réponse à l' O_2 et à l'hème (Gaisne et al., 1999). Il est donc possible que cette étude ait sous-estimé les effets liés à la respiration. De plus, la quantification de l' H_2O_2 produit en présence de PYO a été probablement entachée d'erreurs. Tous ces facteurs constituent une limitation importante à l'étude de Ran et al.

d. Toxicité de la PYO envers les cellules des mammifères (stress oxydatif)

De nombreuses études réalisées sur des cellules eucaryotes d'origine humaine, suggèrent que la PYO est susceptible d'exercer une action toxique sur l'organisme *via* la production de ROS (O'Malley et al., 2004; Muller, 2006; Gloyne et al., 2011).

Une étude récente réalisée sur des cellules épithéliales de poumon (A549) suggère que la PYO exerce sa toxicité *via* l'induction de stress oxydatif. En utilisant une sonde fluorescente, la 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCFH-DA), ses auteurs ont détecté une augmentation de production de l' H_2O_2 en présence de PYO. De plus l'ajout d'un antioxydant N-acétyl cystéine (NAC) protège les cellules (Gloyne et al., 2011).

Muller (2006) a montré que la PYO à une concentration de 25 μM induit l'apoptose des cellules épithéliales de poumon (A549). Par l'utilisation d'un Kit Amplex Red, il a montré une augmentation de production de l' H_2O_2 en présence de PYO. De plus, il a constaté que la quantité d' H_2O_2 détectée au moyen de l'Amplex Red est proportionnelle à la concentration de PYO utilisée. Muller a donc conclu que la PYO exerce sa toxicité sur les cellules A549 *via* l'induction de stress oxydatif.

Kong et al. (2006) ont observé que la PYO provoque l'inactivation de l'ATPase vacuolaire par la génération de ROS (O_2^- , H_2O_2 et $\text{HO}^\bullet$), au niveau des cellules épithéliales nasales. L'ATPase vacuolaire est la pompe à proton essentielle de la plupart des systèmes excréteurs eucaryotes, elle génère le gradient de protons essentiel à la réalisation des échanges osmotique et de solutés. Dans les poumons, l'inhibition de la V-ATPase pourrait altérer la localisation de CFTR à la surface apicale des cellules épithéliales pulmonaires.

Une large variété d'enzymes comporte dans leur site actif un atome métallique ou des groupements thiol qui sont des cibles potentielles naturelles pour les ROS. Un exemple de l'interaction entre O_2^- formé par le recyclage redox de la PYO et les métalloenzymes est donné par l'inhibition de l'activité de l'aconitase.

Gardner (1996) a proposé que la PYO inhibe l'activité de l'aconitase au niveau des cellules épithéliales de poumon (A549) par la production accrue de radicaux superoxydes

($O_2^{\cdot-}$). O'Malley et al. (2003a) ont aussi observé que la PYO provoque l'inhibition des aconitases mitochondriales et cytosoliques des cellules pulmonaires (A549) *via* l' $O_2^{\cdot-}$. Ces enzymes comportent dans leur site actif un centre polymétallique Fe-S qui participe à la catalyse. Ce centre Fe-S est très sensible à l' $O_2^{\cdot-}$, et la perte d'activité des aconitases au niveau des cellules (A549) exposées à la PYO reflète le rôle de PYO dans la génération de stress oxydatif.

De plus, les résultats de Gardner suggèrent qu'une partie au moins du recyclage de la PYO réduite serait intracellulaire ; en effet la désactivation des aconitases implique que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) soit produit à l'intérieur de la cellule, donc la réoxydation d'une partie de la PYO serait intracellulaire. O'Malley et al. (2003a) suggèrent aussi que la production de ROS par la PYO serait intracellulaire : le principal site de production de ROS pourrait être la mitochondrie.

Un autre exemple de l'interaction entre les métalloenzymes et les ROS est représenté par l'inhibition partielle de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) au niveau des cellules pulmonaires (A549) exposée à la PYO (Stewart-Tull et Armstrong, 1972; O'Malley et al., 2003 a). L'activité enzymatique de la SDH est aussi contrôlée par un centre polymétallique Fe-S, très sensible à l' $O_2^{\cdot-}$.

Gardner a constaté que la production des radicaux libres et l'inhibition de l'activité catalytique de l'aconitase par la PYO est beaucoup plus importante à pH acide (pH de l'ordre de 5,5) qu'à pH neutre. Il a observé que la PYO inhibe l'aconitase de ~ 17% à pH neutre et ~ 70% à pH acide. Il a donc conclu qu'à pH acide, la protonation de PYO favorise sa pénétration dans la cellule (A549) et par conséquent favorise la production d' $O_2^{\cdot-}$ et l'inhibition de l'activité catalytique de l'aconitase.

De nombreux travaux expliquent donc la toxicité de la PYO par ses propriétés redox conduisant en présence d'oxygène à la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène soit à l'intérieur (Gardner, 1996; O'Malley et al., 2003a) soit à l'extérieur de la cellule (Hassan et Fridovich, 1980; Müller et al., 1989; Muller, 2002 et 2011).

Britigan et al. (1992) ont suggéré que cette toxicité serait encore renforcée par la présence de pyocheline, sidérophore produit par *Pa*. Ces auteurs ont en effet montré qu'en présence de ferripyocheline, l'addition de NADH à la PYO conduit à la production du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss. Ils ont proposé que la présence simultanée des deux facteurs de virulence accroît la toxicité de la PYO *via* la génération du radical très réactif OH°. En accord avec cette hypothèse, l'addition de PYO à des cellules endothéliales de poumon cultivées en présence de ferripyocheline conduit à la production de radicaux hydroxyles.

Un certain nombre d'études pourrait toutefois être entachées d'erreur.

Ran et al. (2003) puis Gloyne et al. (2011), ont utilisé une sonde fluorescente (H₂DCFH) pour détecter les ROS produits consécutivement à l'ajout de PYO, chez la levure *S. cerevisiae* et chez des cellules pulmonaires. Or O'Malley et al. (2004) ont montré que la PYO peut réagir directement avec la sonde H₂DCFH (désacétylée) et provoque la formation de H₂DCF indépendamment des ROS. Des nombreuses autres sondes fluorescentes 2',7'-diclorodihydrofluoréine (DCFH₂), 5 et 6 carboxy-2',7'-diclorodihydrofluoréine (5&6 CDCFH₂) et dihydrorhodamine (DHR123) ont aussi montré une forte interaction avec la PYO (O'Malley et al., 2004). Les conclusions tirées de l'étude de Gloyne et al. (2011) et celle de Ran et al. sont donc à considérer avec prudence.

Une autre étude a montré que la PYO peut être oxydée par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de microperoxydase 11 (MP 11). Cette oxydation induirait l'inactivation irréversible de la PYO et semble impliquer la fonction phénol de la PYO, car la MP 11 est incapable d'inactiver la phénazine méthosulfate (PMS). Il est admis que les dérivés phénoliques peuvent servir de substrats pour la peroxydase (Reszka et al., 2004). La PYO pourrait contribuer à l'élimination du peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase. Cette étude attribue donc à la PYO un rôle potentiellement antioxydant.

e. Interaction de la PYO avec les systèmes de défense antioxydants et antimicrobiens de l'hôte

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes de défense antioxydants. Les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ROS, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres, ou en permettant la formation du glutathion (GSH).

En plus de son rôle admis dans la génération de ROS (stress oxydatif), la PYO est connue pour altérer les défenses antioxydantes et antimicrobiennes des cellules hôtes.

De nombreuses études réalisées sur des cellules eucaryotes d'origine humaine, suggèrent que la PYO altère les systèmes de défense enzymatiques antioxydants.

O'Malley et al. (2003b) ont constaté une baisse de l'activité enzymatique de catalase au niveau des cellules épithéliales de poumon en présence de PYO.

La catalase est l'une des enzymes antioxydantes essentielles. Elle réagit très rapidement avec l' H_2O_2 pour donner de l'eau et de l' O_2 . La catalase humaine est une enzyme tétramérique, formée de quatre hèmes, pouvant fixer chacun une molécule de NADPH. La catalase possède donc une activité enzymatique NADPH dépendante. Etant donné que la PYO peut oxyder directement le NADPH, cela conduit à l'inactivation de catalase (O'Malley et al., 2003b).

Muller (2009) a suggéré que la PYO pourrait inhiber l'activité de la NQO1 (NAD(P)H quinone oxydoréductase ou DT-diaphorase) dans les cellules de mammifères telles les cellules épithéliales de poumon "A549". La NQO1 est une enzyme de détoxification, elle possède des fonctions de neutralisation du stress oxydatif par réduction de quinones. En effet, elle catalyse la réduction de nombreuses quinones, en hydroxy-quinones (Gliszczyńska-Świgło et al., 2003), par transfert de deux électrons en utilisant le NAD(P)H comme co-facteur réduit (Lind et al., 1982). Cette "double" réduction empêche la formation de semi-quinones. Elle protège ainsi la cellule des semi-quinones et des ROS dérivés. Muller a suggéré que la PYO inhibe la NQO1 à des concentrations de l'ordre de 10 μM . Le même taux

d'inhibition a été obtenu avec le dicoumarol (20 μ M), inhibiteur spécifique et compétitif de NQO1 (Dinkova-Kostova et Talalay, 2000). Cependant, le mécanisme par lequel la PYO inhibe la NQO1 n'a pas été élucidé.

Comme précédemment mentionné, la PYO induit une déplétion en glutathion. Le glutathion est le principal antioxydant dans la cellule, il participe activement à la destruction des ROS.

La PYO altère également les défenses antimicrobiennes de l'hôte. En effet, la PYO "détourne" le NADPH des neutrophiles (Müller et al., 1989) ou des cellules épithéliales (Rada et al., 2008). La PYO est alors doublement néfaste en empêchant les cellules de remplir leur fonction tout en générant chez elles un stress oxydatif.

Un mécanisme d'inhibition similaire a été proposé pour le système "lactoperoxydase/thiocyanate/dual oxydases (Duox)" impliqué dans les défenses antimicrobiennes au niveau des muqueuses pulmonaires (Rada et al., 2008).

3. Interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire

Compte-tenu de sa structure (**Figure 10**) et de son potentiel rédox (-34 mv à pH7,0) la PYO pourrait interagir avec la chaîne respiratoire des cellules cibles, et court-circuiter le transfert des électrons (**Tableau 2**).

Tableau 2: Les potentiels d'oxydo-réduction (E° en mv, pH7,0) des composants de la chaîne respiratoire.

Composants de la chaîne respiratoire		E° (mv), pH=7,0
	NADH	-280
Complexe I	flavine mononucléotide	-220
	Ubiquinone	-80
Complexe III	Cytochrome b	-50
	Cytochrome c1	+220
	Cytochrome c	+250
Complexe IV	Cytochrome aa3	+280
	O ₂	+810

L'équipe de Baron (Baron et Rowe, 1981; Baron et al., 1989) a expliqué l'effet bactéricide de la PYO par ce mécanisme et remis en cause les explications formulées précédemment par Hassan et Fridovitch (1980). Ils ont suggéré que la toxicité de PYO n'est pas liée à sa capacité à induire un stress oxydatif. En effet, ces auteurs ont notamment constaté l'absence de corrélation entre l'activité SOD et la sensibilité ou la résistance des bactéries à la PYO (**Tableau 3**). Certaines bactéries sensibles à la PYO (*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*) possèdent des activités SOD élevées et des bactéries résistantes

(*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas denitrificans* et *Pseudomonas aeruginosa*) possèdent des activités SOD faibles.

De plus, Baron et al ont montré que certaines bactéries dénitrifiantes sont plus sensibles à la PYO en anaérobie qu'en aérobie. Ils ont donc suggéré que l'activité antibiotique de la PYO est indépendante de la présence d'O₂, mais nécessite une respiration.

Tableau 3 : L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et la sensibilité à la PYO de différentes bactéries (Baron et al., 1989).

Micro-organisme	Activité SOD (u/mg de protéine)	CMI (µg/ml)
<i>A.Faecalis</i>	255,0	12,5
<i>B. megaterium</i>	181,5	10,0
<i>B. cereus</i>	113,4	14,5
<i>S. epidermidis</i>	46,0	10,5
<i>S. aureus</i>	25,0	6,0
<i>Pa. denitrificans</i>	19,5	8,0
<i>B licheniformis</i>	17,0	20,0
<i>Acinetobacter H01-N</i>	15,6	12,0
<i>Serratia marcescens</i>	11,8	17,8
<i>E. coli</i>	11,2	44,0
<i>P. aeruginosa</i>	9,4	Résistant
<i>A.Subtilis</i>	9,3	17,8
<i>P. denitrificans</i>	9,2	Résistant
<i>K pneumoniae</i>	6,3	20,0
<i>S typhimurium</i>	6,0	18,2

Par l'utilisation d'une électrode à oxygène, Baron et al. (1989) ont montré que la PYO inhibe la respiration de deux bactéries (*E. coli* et *M. luteus*) mais qu'elle est sans effet sur la respiration de son propre producteur *P. aeruginosa*. Ils en ont donc déduit que l'activité bactéricide de la PYO résulte de son interaction avec la chaîne respiratoire, inhibant les processus énergétiques et le transport actif de solutés. En accord avec cette hypothèse, les

auteurs de cette étude ont constaté que le transport du glutamate est perturbé en présence de PYO.

Afin de localiser à quel niveau de la chaîne respiratoire, la PYO pourrait capter des électrons, la consommation d'oxygène par les bactéries a été suivie en présence de cyanure (KCN). Le cyanure inhibe les cytochromes oxydases à hème-cuivre (oxydases terminales des chaînes respiratoires). L'ajout de PYO après addition de KCN permet une reprise de la consommation d'O₂ chez *E. coli* (**Figure 15**). La PYO pourrait donc capter des électrons en amont de la cytochrome oxydase (Baron et al., 1989).

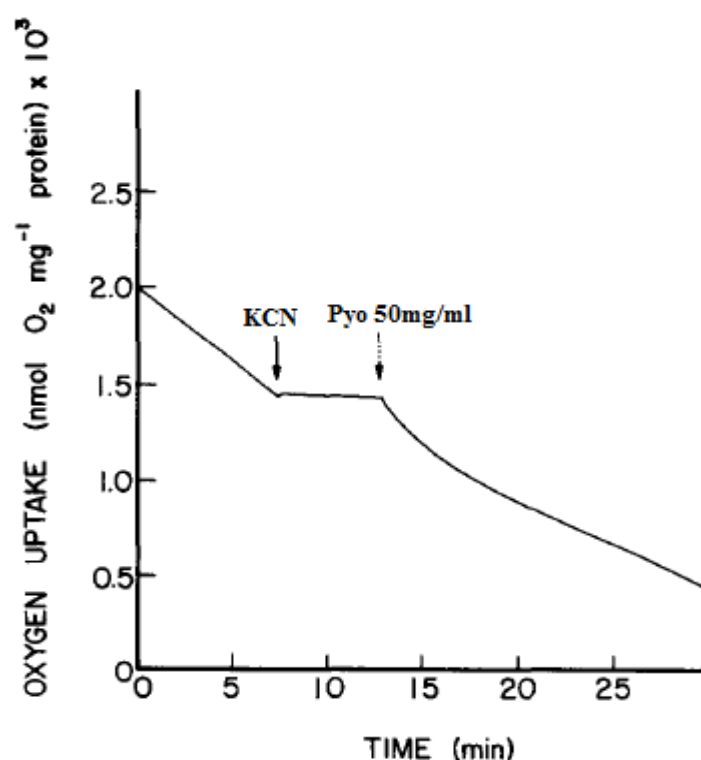


Figure 15: Respiration résistante au cyanure d'*E.coli*, en présence de 50 mg/ml PYO. Modifiée de Baron et al. (1989).

Cette respiration résistante au cyanure en présence de PYO ne permet pas de conclure quant à une interaction directe de la PYO avec la chaîne respiratoire. En effet, la PYO pourrait également capter les électrons au niveau du pool de NADH pour les transférer directement à l'O₂ et ainsi produire des ROS (Hassan et Fridovich, 1980).

L'étude réalisée par Armstrong et Stewart-Tull (1971), a suggéré que la 1-hydroxyphénazine (25-33 $\mu\text{g/ml}$) est capable de provoquer une inhibition complète de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (mitochondries isolées de foie de souris) et que la PYO (50 $\mu\text{g/ml}$) provoque une faible inhibition.

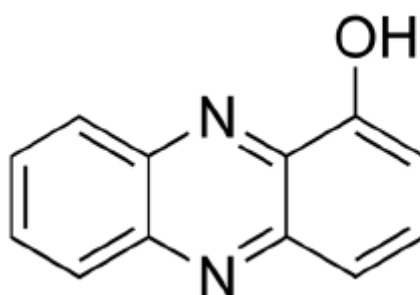


Figure 16: Formule développée de la 1-hydroxyphénazine.

Ils ont également suggéré que la 1-hydroxyphénazine (qui peut être obtenue par déméthylation de la PYO) (**Figure 16**) pourrait inhiber la respiration mitochondriale en captant les électrons au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire, et en empêchant donc le transfert d'électrons aux complexes III et IV (**Figure 17**). En effet, l'ajout d'ubiquinone (100 $\mu\text{g/ml}$) après la 1-hydroxyphénazine permet une reprise de la respiration mitochondriale, et l'ajout d'ubiquinone avant la 1-hydroxyphénazine permet une protection partielle de la respiration mitochondriale. Armstrong et Stewart-Tull (1971) en ont donc conclu que la 1-hydroxyphenazine peut capter d'électrons au niveau du pool d'ubiquinone.

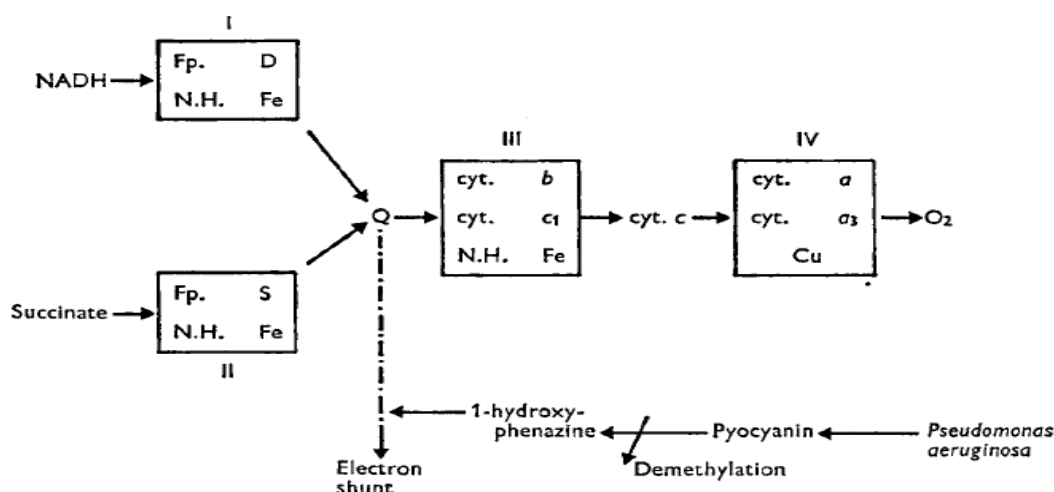


Figure 17: Le site d'activité de la 1-hydroxyphénazine, d'après Armstrong et Stewart-Tull, (1971).

O'Malley et al. (2003 a) ont montré que l'exposition des cellules pulmonaires (A549) à la PYO (50 μ M) engendre une altération de la structure des mitochondries, et entraîne une déplétion en ATP. Ces auteurs ont ainsi montré que la sur-expression de la SOD mitochondriale (Mn-SOD) protège des effets délétères de la PYO mais pas une surexpression de la catalase ou de la SOD cytosolique (Cu-Zn SOD). A partir de l'ensemble de ces résultats, O'Malley, Abdalla et al. ont conclu que le principal site de production d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 par la PYO au niveau des cellules pulmonaires serait la mitochondrie et donc que le recyclage redox de la PYO est intracellulaire et même intra-mitochondrial. Cette conclusion contredit les explications formulées précédemment par Hassan et Fridovich (1980), Müller et al. (1989), puis Muller (2002 et 2011), où la PYO génère de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et par dismutation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'extérieur de la cellule.

De même, l'étude réalisée par Dowling et al. (1997) a démontré que l'exposition de cellules de muqueuse nasale humaine à la PYO provoque des dégâts importants au niveau des mitochondries.

a. Interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire des *Staphylocoques*

Les infections broncho-pulmonaire au cours de la mucoviscidose impliquent très fréquemment *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Hoffman et al. (2006) ont observé que la coculture de *Staphylococcus aureus* en présence de *Pa* ou en présence de

HQNO (un des poisons respiratoires produits par *Pa*) induit l'apparition de souches de *Staphylococcus aureus* communément appelées "Small-colony variants SCVs" Variants petites colonies. L'apparition de ce phénotype a été expliquée par l'inhibition du complexe bc₁ de la chaîne respiratoire des staphylocoques par le HQNO. Il en résulte une croissance bactérienne plus lente et une morphologie atypique. De plus ces variants sont caractérisés par une plus grande résistance aux aminoglycosides.

Ce même phénotype (petites colonies) a été observé chez certains staphylocoques en présence de PYO. Voggu et al. (2006) ont divisé les staphylocoques en deux groupes : le groupe sensible aux inhibiteurs de la respiration produits par *Pa* (PYO, HCN et HQNO), comprend *S. aureus* et *S. epidermidis*. Le groupe résistant comprend *S. carnosus*, *S. piscifermentans* et *S. gallinarum*. La résistance de ce dernier groupe a été expliquée par la présence des gènes cydAB qui code pour une cytochrome bd quinol oxydase (cytochrome bd) insensible au cyanure et à la PYO.

Chez les staphylocoques résistants, la NADH déshydrogénase transfère les électrons au pool de menaquinone, les électrons sont ensuite transférés soit au cytochrome b (cyt b) puis aux oxydases terminales (cyt aa₃, cyt o), soit directement au cytochrome bd qui les transfère à l'O₂ (**Figure 18**).

La PYO pourrait capter des électrons soit entre le pool de menaquinone et le cytochrome b, et/ou au niveau des oxydases terminales (cyt aa₃, cyt o). Le cytochrome bd pourrait donc protéger de l'inhibition provoquée par le Cyanure, le HQNO et probablement la PYO. L'absence de cette oxydase, appartenant à la même famille que l'oxydase CIO de *Pa*, empêcherait *Staphylococcus* de respirer *Pa* est présente.

Voggu et al. ont indiqué que cette sensibilité à la PYO en fonction de la composition de la chaîne respiratoire va à l'encontre de l'hypothèse impliquant l'oxydation directe de la PYO par le NAD(P)H et la production de ROS.

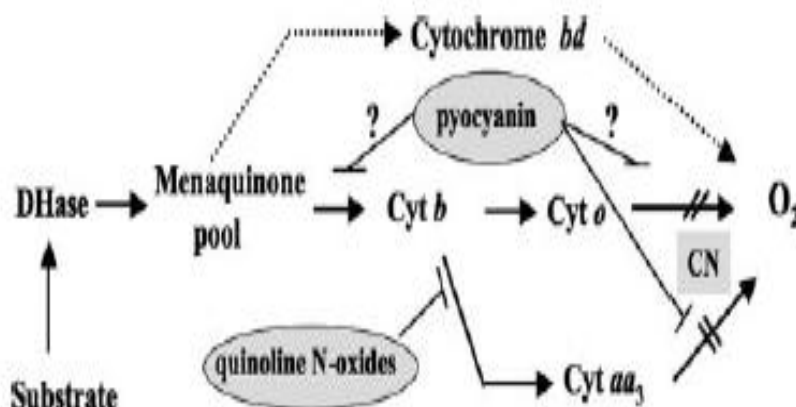


Figure 18: Mécanisme de résistance de certains staphylocoques aux poisons respiratoires produits par *P. aeruginosa*, d'après Voggu et al. (2006).

4. Les bénéfices de la PYO chez *P. aeruginosa*

Outre sa contribution majeure à la virulence de *Pa* et son action antimicrobienne potentielle, la PYO semble jouer plusieurs rôles physiologiques bénéfiques pour son producteur *Pa* : participation au QS, maintenance de la balance redox, acquisition du fer protection contre le stress oxydatif chez le mutant OxyR et développement du biofilm.

En effet, la PYO peut jouer le rôle d'une molécule - signal terminal du quorum sensing chez PA14 et PAO1, en phase stationnaire (Dietrich et al., 2006). Elle régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'expression de pompes d'efflux, les processus redox et l'acquisition du fer.

La PYO peut coordonner l'induction de l'expression de gènes de pompes à efflux *MexGHI-OpmD* et le gène codant pour une monooxygénase flavine-dépendante *PA2274*. Dietrich et al ont montré que la PYO joue un rôle "signal" en phase stationnaire en activant le facteur de transcription SoxR, qui activerait à son tour des gènes *MexGHI-OpmD* et *PA2274* (**Figure 19**).

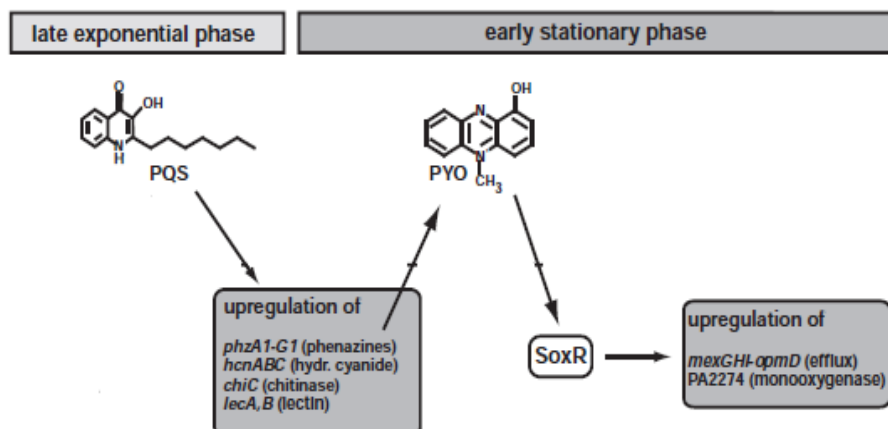


Figure 19 : Rôle de la pyocyanine dans le contrôle de la signalisation du Quorum sensing, modifié de Dietrich et al. (2006).

De plus, Price-Whelan et al. (2007) ont montré qu'en l'absence d'accepteurs d'électrons appropriés, la PYO pourrait jouer un rôle clé dans la maintenance de l'équilibre redox et du métabolisme central chez *Pa*. En phase stationnaire, les mutants affectés dans la synthèse de phénazines [PA14 $\Delta phz1-2$ ($\Delta phzA1-G1 \Delta phzA2-G2$)] ont une concentration plus élevée en NADH que la souche de référence PA14WT. L'ajout de la PYO exogène dans la culture de PA14 $\Delta phz1-2$ provoque une diminution de la concentration en NADH. De plus, l'analyse des acides organiques extracellulaires du surnageant de PA14 en phase stationnaire, a montré l'accumulation de pyruvate dans le surnageant de la souche PA14WT et pas dans le surnageant de PA14 $\Delta phz1-2$. L'ajout de la PYO exogène chez PA14 $\Delta phz1-2$ provoque l'accumulation du pyruvate. Price-Whelan et al. (2007) ont alors proposé un mécanisme pour expliquer le rôle physiologique de la PYO dans la maintenance de l'équilibre redox chez *Pa* (Figure 20) :

En phase stationnaire, lorsque l'oxygène devient limitant, le NADH s'accumule, la PYO est alors sécrétée et participe à l'oxydation du NADH soit directement ou par le biais d'un enzyme (PYO réductase). La PYO inhibe aussi probablement la pyruvate déshydrogénase pour empêcher la réduction du NAD^+ en NADH.

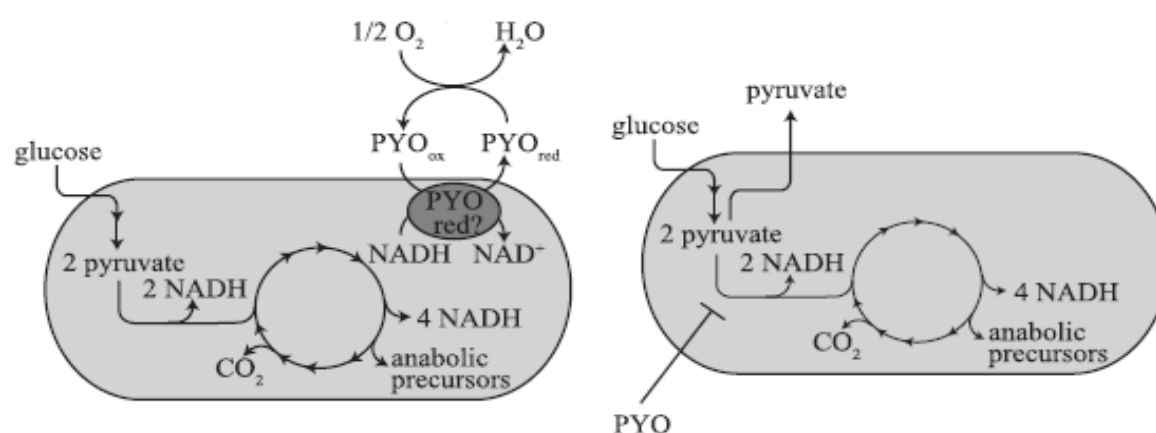


Figure 20 : Rôle physiologique de la pyocyanine dans la maintenance de l'équilibre redox chez *Pa*, modifié de Price-Whelan et al. (2007).

Une étude récente (Wang et al., 2010) a montré que les phénazines endogènes (la pyocyanine, la phénazine 1-carboxylique acide et la 1-hydroxyphénazine) jouent un rôle dans la survie de *Pa* en anaérobiose en cas de limitation en oxydants (nitrates...). Cependant, ces phénazines ne permettent pas le développement de *Pa* en anaérobiose. En effet, Wang et al. ont montré que la souche défectueuse dans la production des phénazines (PA14 $\Delta phz1/2$) est incapable de survivre en anaérobiose, alors que la souche parentale (PA14 WT) peut survivre en anaérobiose en présence de glucose. De plus, la capacité de survie en anaérobiose est restaurée par l'ajout de la PYO exogène chez un mutant PA14 $\Delta phz1-2$ en présence de glucose. Wang et al. ont alors suggéré que le glucose fournirait indirectement les électrons aux phénazines, ce qui pourrait permettre la survie de *Pa* en anaérobiose. Cependant, le mécanisme exact n'a pas été détaillé.

Vinckx et al. (2010) ont constaté la surproduction de PYO par le mutant OxyR de PAO1. Ils ont également montré que la croissance du mutant OxyR sur milieu LB est restaurée par l'ajout de la PYO exogène. OxyR est un régulateur transcriptionnel de la famille LysR, répondant spécifiquement à la présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, OxyR régule l'expression des gènes codant des protéines de détoxification chez *Pa* et en particulier la catalase (*katB*) et les deux alkylhydroperoxyde

réductase (*ahpB* et *ahpCF*) (Ochsner et al., 2000). Vinckx et al. (2010) ont alors suggéré que la PYO joue un rôle protecteur antioxydant chez le mutant OxyR.

La PYO peut modifier la disponibilité du fer présent dans le milieu. Wang et Newman, (2008) ont montré que les phénazines et plus particulièrement la PYO peuvent réduire l'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) en fer ferreux (Fe^{2+}), et que cette réaction est inhibée par la présence d' O_2 . Selon Cox (1986), la PYO participerait au métabolisme du fer chez *Pa*. Elle jouerait un rôle dans la persistance et la croissance de la bactérie grâce à sa capacité de transport du fer lié à la transferrine.

De nombreuses études suggèrent que la PYO pourrait avoir une influence sur la formation du biofilm chez *Pa*.

Ramos et al. (2010) ont suggéré que la PYO participe à la structuration des biofilms de *Pa*. Ils ont rapporté que la structure d'un biofilm, formé par une souche défectueuse dans la production des phénazines et de la PYO (PA14 $\Delta phz1/2$), est plate, et peu différenciée en raison de l'absence de formation des micro-colonies. Ainsi, la souche PA14 $\Delta phz1/2$ forme un biofilm d'une épaisseur de 40 μm alors qu'une souche parent peut donner un biofilm ayant une épaisseur de 57 μm . L'ajout de PYO (25 μM) chez PA14 $\Delta phz1/2$ permet la formation d'un biofilm identique à celui de la souche parent.

Arai (2011) suggère que la PYO joue un rôle dans les régions enfouies et anaérobiques du biofilm de *Pa*. En effet, au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments, et d'autre part d'évacuer les déchets. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un microenvironnement anaérobie. La PYO permet de maintenir la survie des micro-colonies dans ce microenvironnement anaérobie en contrôlant la balance redox par l'oxydation de surplus de NADH et en favorisant la sécrétion de pyruvate dans les zones aérobies du biofilm (**Figure 21**). Le pyruvate ainsi secrété sera utilisé par les micro-colonies de la zone anaérobie du biofilm.

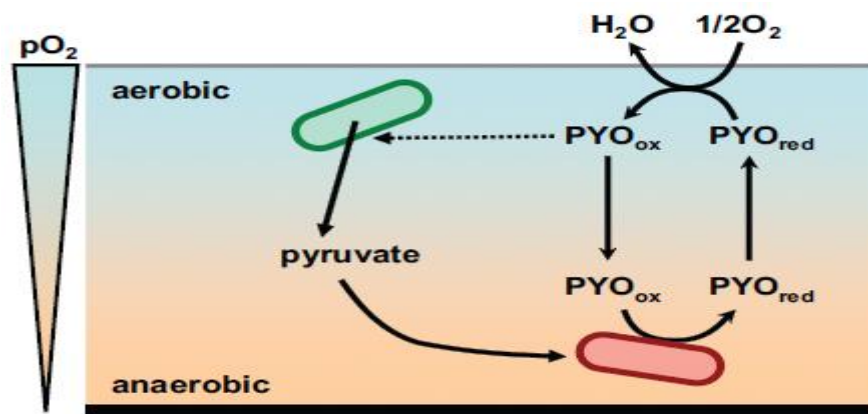


Figure 21 : le Rôle physiologique de la pyocyanine dans la structuration du biofilm de *Pa.* (Arai, 2011).

Une étude récente a montré la présence de grandes quantités de PYO au sein du biofilm formé par la souche parent de PA14 (PA14WT). La PYO était présente sous sa forme réduite au sein du biofilm et sous sa forme oxydée dans l'environnement entourant le biofilm (**Figure 22**). Le gradient d'oxydation de PYO existant au sein du biofilm fut baptisé par l'auteur "PYO electrocline". La formation de ce gradient a été observé en conditions de limitation en accepteur terminal d'électrons, et il a été corrélé avec une augmentation du taux de Fer soluble (Fe^{2+}) (Koley et al., 2011).

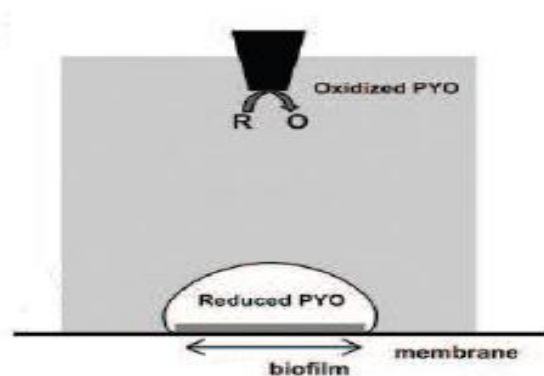


Figure 22 : La formation d'un gradient d'oxydation de la pyo au sein du biofilm de *Pa.* (Koley et al., 2011).

L'ajout de NO_3^- en excès inhibe la formation du gradient au sein du biofilm. Cependant, chez le mutant *napA* (mutant affecté dans l'activité de nitrate réductase), l'ajout de NO_3^- en excès au sein du biofilm n'affecte pas la formation du gradient. De plus, le gradient de PYO n'a pas été observé au sein du biofilm formé par le mutant PA14 ΔfbcC (mutant affecté dans l'activité du complexe bc_1). Koley et al ont donc suggéré que le site de réduction de la PYO se situe entre le complexe bc_1 et la cytochrome c oxydase et que le complexe bc_1 semble jouer un rôle primordial dans la réduction de la PYO. Cela suggère aussi que la PYO sert de navette pour le transport d'électrons entre la chaîne respiratoire de *Pa* et le fer ferrique à l'extérieur de la cellule le rendant ainsi plus disponible (Fer ferreux Fe^{2+}).

Contexte et Objectifs de l'étude

La pyocyanine est un pigment phénazinique spécifique à *pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer sa toxicité aérobie envers les cellules de mammifères (cellules épithéliales de poumon, des neutrophiles...), les levures telles que *Candida* ou *Cryptococcus* ou encore les bactéries.

En effet, la PYO est une molécule redox active qui pourrait capter des électrons à partir de nombreux agents réducteurs (NADH, NADPH) et de la chaîne respiratoire. En présence d'O₂ elle céderait son/ses électron(s) à l'O₂ et induit ainsi la formation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène soit à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule cible. Pour certaines études, les propriétés pro-oxydantes de la PYO pourraient cependant avoir été surestimées.

En captant les électrons au niveau de la chaîne respiratoire, la PYO pourrait ainsi inhiber les processus énergétiques (production d'ATP). Cette hypothèse a été formulée pour expliquer la toxicité de la PYO envers les bactéries, mais sans précision sur le site précis d'action de la PYO au niveau de la chaîne respiratoire.

L'analyse de la littérature montre que la toxicité de la PYO a principalement été étudiée en aérobie, en particulier dans le cas de cellules eucaryotes. Or, ces conditions ne reflètent pas les conditions physiopathologiques. En effet, *Pa* et les cellules cibles sont confrontées à de très fortes limitations en O₂ dans le contexte infectieux (ex : poumons de malades atteints de mucoviscidose). Peu de données sont cependant disponibles en ce qui concerne la toxicité de la PYO en conditions de limitation et d'absence d'O₂.

La PYO pourrait également jouer de nombreux rôles physiologiques chez *Pa*. Elle a également été décrite en tant que pigment respiratoires alterne chez *Pa* (Friedheim, et Michaelis, 1931). Cependant, l'effet direct de la PYO sur la respiration de *Pa* n'a pas été bien documenté : peu d'auteurs ont étudié ces aspects, les outils de mesure n'étaient pas précis et les conditions physiologiques pouvaient être inappropriées (ex : aérobiose, milieux riches, phase de croissance).

Dans ce contexte général, l'objectif de notre étude était d'examiner ou de réexaminer les propriétés biologiques de la PYO en étudiant conjointement ses effets sur un modèle eucaryote, sur un panel large de bactéries et sur la bactérie productrice *Pa*. Une attention particulière a été portée sur les conditions de culture et d'oxygénation (aérobie, hypoxie ou anaérobie) et la compétence respiratoire (aérobie ou anaérobie). La toxicité globale de la PYO a été évaluée par des mesures simples de croissance. Sa toxicité respiratoire a été déterminée sur cellules ou sur mitochondries isolées par des mesures haute résolution de flux d'O₂ (Oxygraphe O2k Oroboros®). Ponctuellement, les toxicités respiratoires combinées de la PYO, du cyanure et de HQNO (trois facteurs de virulence produits par *Pa* en hypoxie) ont été mesurées. Contrairement à la majorité des études antérieures qui ont utilisé la PYO purifiée à partir de surnageant de culture de *Pa*, nous avons utilisé de la PYO commerciale purifiée pour l'ensemble de nos expérimentations.

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

a. *Pseudomonas aeruginosa* (PA14)

La souche PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*, a été utilisée comme souche de référence pour l'étude de l'effet de la PYO sur la respiration de *Pa*. PA14 est un isolat clinique (Rahme et al., 1995), qui produit dix fois plus de PYO que la souche PAO1 (Dietrich et al., 2006). Elle porte une mutation sur le gène *ladS* et, comparée à la souche PAO1, elle présente un niveau de cytotoxicité accrue envers les cellules de mammifères (Mikkelsen et al., 2011). Différents mutants dérivés de cette souche ont été conçus en concertation avec l'équipe de Dianne Newman (Caltech, Californie, USA) (**Tableau 4**). La souche sauvage et tous les mutants ont été cultivés sur milieu LB à 37°C. Les caractéristiques de ces différents mutants sont discutées dans le chapitre III de la partie résultats et discussion.

Tableau 4 : Liste des mutants de PA14 utilisés lors de cette étude.

Souche	Production de phénazines	Chaîne respiratoire
PA14WT	oui	Normale
PA14 Δ phz1-2 ⁽¹⁾	non	Normale
PA14 Δ CioAB	oui	Absence de la quinol oxydase CIO
PA14 Δ phz1-2 Δ CioAB	non	Absence de la quinol oxydase CIO
PA14 Δ CyoABCD	oui	Absence de la quinol oxydase bo3
PA14 Δ phz1-2 Δ CyoABCD	non	Absence de la quinol oxydase bo3
PA14 Δ CioAB Δ CyoABCD	oui	Absence de CIO et bo3
PA14 Δ phz1-2 Δ CioAB Δ CyoABCD	non	Absence de CIO et bo3
PA14 Δ fbcC ⁽²⁾	oui	Complexe bc ₁ inactifs
PA14 Δ phz1-2 Δ fbcC ⁽²⁾	non	Complexe bc ₁ inactifs

⁽¹⁾ Δ phz1-2 est une abréviation indiquant que les deux opérons *phzA1, B1, C1, D1, E1, F1, G1* et *phzA2, B2, C2, D2, E2, F2, G2* ne sont plus fonctionnels ⁽²⁾ FbcC est une sous-unité du complexe bc₁ (complexe III)

b. Autres bactéries

La liste des bactéries utilisées pour cette étude est détaillée dans le **tableau 5**. Toutes les souches proviennent de la collection de notre laboratoire.

L'ensemble des souches a été cultivé sur milieu cœur cerveau (BHI) hormis les *Vibrio*, cultivés sur milieu Marine Broth (MB).

Tableau 5 : Principales souches de bactéries et conditions de cultures utilisées dans ce travail.

Nom	Milieux de culture	Température de croissance	Origine
Bactéries Gram positives			
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Micrococcus luteus</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Bacillus subtilis</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Bacillus megatherium</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
Bactéries Gram négatives			
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Pseudomonas putida</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Xanthomonas campestris</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Burkholderia pseudocepacia</i>	BHI	30°C	Coll.Lab
<i>Escherichia coli</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Klebsiella pneumonia</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Salmonella thyphimurium</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Proteus vulgaris</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Serratia marcerens</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Enterobacter cloacae</i>	BHI	37°C	Coll.Lab
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	MB	30°C	Coll.Lab
<i>Vibrio splendidus</i>	MB	30°C	Coll.Lab
<i>Vibrio anguillarum</i>	MB	30°C	Coll.Lab

c. *Saccharomyces cerevisiae*

La liste des souches et des mutants simples de *Saccharomyces cerevisiae* utilisés pour cette étude est détaillée dans le **tableau 6**. La grande majorité de ces souches provient de la collection EUROSCARF. Certaines souches ont été construites en interne ou par nos collaborateurs. La souche sauvage WT-BY restaurée a été gracieusement fournie par le Dr. Anne DEVIN de l'IBGC-CNRS Bordeaux. Les souches délétées pour les gènes codant les pompes d'efflux de type ABC, ont été commandées chez UCL mycothèque (Louvain-la-Neuve, Belgique). Les mutants *hem1* et *erg1* ont construits par Thierry Bergès (IPBC, Université de Poitiers).

Les souches sauvages et tous les mutants ont été cultivés à 30°C. Tous les mutants simples sont résistants à la généticine (G418 sulfate) 100 mg/l. Les mutants *hem1* et *erg1* doivent être cultivés en présence de Facteurs Anaérobies (FA). Le mutant *erg1* est anaérobie stricte et les mutants *hem1* est conservé en présence du précurseur de la synthèse d'hème (l'acide δ -aminolévulinique δ -ALA 40 mg/l) pour éviter l'apparition de mutations au niveau du génome mitochondrial (apparition de "petites" colonies). Leurs caractéristiques sont décrites dans le chapitre I de la partie Résultats et discussion.

Tableau 6 : Principales souches de *S. cerevisiae* et conditions de cultures utilisées.

Nom de la souche	Génotype	Milieux de culture	Origine
WT-BY	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; ura3 Δ 0	YPD	Euroscarf
W303	leu2, ade2, his3, trp1, ura3	YPD	IBGC-Bordeaux
WT-BY restaurée	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; ura3 Δ 0	YNB	IBGC- Bordeaux
<i>zwf1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YNL241c::kanMX4	YPD+G418	Euroscarf
<i>yap1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YML007w::kanMX4	YPD+G418	Euroscarf
<i>rho</i> ^o	Pas d'ADN mitochondrial	YPD	Coll.Lab
<i>sod1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YJR104c::kanMX4	YPD+G418	Euroscarf
<i>ctt1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YGR088w::kanMX4	YPD+G418	Euroscarf
<i>skn7</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YHR206w::kanMX4	YPD+G418	Euroscarf
<i>hem1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YDR232w::kanMX4	YPD+G418+D-ala	IPBC-Poitiers
<i>erg1</i>	mat α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; lys Δ 0 ; met15 ; ura3 Δ 0; YGR175C::kanMX4	YPD+G418+FA	IPBC-Poitiers
AD1-9	mat α , ura3, his1, yor1 Δ , snq2 Δ , pdr5- Δ 2, pdr10 Δ , pdr11 Δ , ycf1 Δ , pdr3- Δ 2, pdr15 Δ , pdr1- Δ 3	DYPA	UCL-Belgique
US50-18C	mat α , pdr1-3, ura3, his1	DYPA	Belgique
222-95C (WT)	mat α , PDR1, ura3	DYPA	Belgique

d. Conservation des souches

Toutes les souches utilisées lors de cette étude ont été conservées à - 80°C. Les aliquots pour congélation ont été préparés en mélangeant un volume équivalent d'une culture en phase exponentielle de croissance à une solution de glycérol 60 % stérile.

2. Milieux et conditions de culture

a. Milieux riches

Extrait de levure peptone dextrose (YPD)

Extrait de levure	10,0 g
Peptone de viande	10,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,2 g
D-glucose	20,0 g
Eau distillée	1 L

Extrait de levure peptone Glycérol (YEPGly)

Extrait de levure	10,0 g
Peptone de viande	10,0 g
Phosphate de potassium	1,0 g
Sulfate d'ammonium	1,2 g
Glycérol	20,0 g
Eau distillée	1 L

Extrait de levure peptone dextrose (DYPA)

Extrait de levure	5,0 g
Peptone de viande	10,0 g
D-glucose	20,0 g
Eau distillée	1 L

Milieu cœur cerveau (BHI)

Bouillon cœur cerveau (Bio-Rad)	37,0 g
Eau distillée	1 L

Milieu de Luria Bertani (LB)

LB (Difco)	25,0 g
Eau distillée	1 L

Milieu Bouillon Marine (MB)

MB (Bio-Rad)	40 g
Eau distillée	1 L

Pour les milieux gélosés, 12 g/l d'agar sont ajoutés au milieu avant qu'ils ne soient autoclavés. Le pH des milieux YPD et YEPGly est ajusté à 5,5 avec H_2SO_4 2 M avant stérilisation.

b. Milieux synthétiques et tampons

Milieu MOPS (Price-Whelan et al., 2007) :

MOPS	10,46 g
NH_4Cl	5,0 g
NaCl	2,5 g
KH_2PO_4	0,5 g
Eau distillée	1 L

Cette préparation est ajustée à pH 7,2 puis autoclavée 20 min à 115°C.

1 ml de MgSO_4 1,0 M (stérilisé par autoclavage) et 1 ml de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 1 mg/ml (stérilisé par filtration sur filtre 0,22 μm) ainsi qu'une source de carbone (succinate 40 mM, D-glucose 20 mM ou D-L Lactate 40 mM stérilisés par filtration sur filtre 0,22 μm) sont ajoutés avant inoculation des bactéries.

Milieu A (Baron et Rowe, 1981):

K ₂ HPO ₄	7,0 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,24 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
Extrait de levure	1,0 g
D-glucose	1,0 g
Eau distillée	1 L

Le pH de ce milieu est ajusté à 7,0

Milieu A modifié (cette étude) :

L'apport en carbone est augmenté par rapport au milieu A, soit pour 1 litre de milieu, 5 g de glucose. Pour la culture en anaérobie, une source d'azote est rajoutée au milieu (KNO₃ 50 mM).

Milieu YNB " Yeast Nitrogen Base"

"Yeast Nitrogen base W/o amino acids"	6,7 g/l
(Sigma)	
D-glucose	20 g/l
Eau distillée	1 L

Facteurs anaérobies (FA) :

Ethanol	10 ml
Tween 80	10 ml
Ergostérol	300 mg

Les "Facteurs anaérobies" (FA) sont préparés 1000 fois plus concentrés et conservés à +4°C à l'abri de la lumière. Les facteurs anaérobies sont utilisés après un chauffage à 70°C (10 min) nécessaire pour solubiliser l'ergostérol.

Tampon A (Baron et Rowe, 1981) :

K ₂ HPO ₄	7,0 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,24 g
Eau distillée	1 L
Le pH est égal à 7,0	

Tampon Trizma

Trizma-maléate (0,1 M final)	23,72 g
KH ₂ PO ₄ (10 mM)	2,28 g
Eau distillée	1 L

Ce tampon est ajusté à pH 5,5 avec H₂SO₄ 2 M puis autoclavée 20 min à 115°C.

Tampon phosphate (100 mM, pH 6,8)

K ₂ HPO ₄	8,64 g
KH ₂ PO ₄	6,84 g
Eau distillée	1 L

Tampon KE (Watson et al., 1983)

K ₂ HPO ₄	5,35 g
KH ₂ PO ₄	2,61 g
EDTA	0,372 g
Eau distillée	1 L

Ce tampon est ajusté à pH 7,0 avec H₂SO₄ 2 M.

Milieu SM (modifié d'après Wu et al., 2005) :

Pour 1 litre :

D-glucose	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	11,8 g
K ₂ HPO ₄	2,3 g
MgSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Acides aminés et bases azotées	
L-histidine	100 mg
L-méthionine	100 mg
L-leucine	100 mg
L-lysine	100 mg
L-méthionine	100 mg
Uracile	100 mg
L-tryptophane	100 mg
Adénine	100 mg
Vitamines et autres	
Calcium panthothenate	20 mg
Acide folique	20 µg
Inositol	100 mg
Acide nicotinique	4 mg
Acide p-aminobenzoïque	2 mg
Pyridoxine hydrochloride	4 mg
Riboflavine	2 mg
Thiamine hydrochloride	4 mg
Oligo-éléments	
H ₃ BO ₃	5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,4 mg
KI	1 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	2 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	4 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4 mg

Les acides aminés, les oligo-éléments et les vitamines sont ajoutés à partir de solutions mères 100 fois concentrées, et conservées à -20°C.

c. Stérilisation des milieux

Tous les milieux ont été autoclavés 20 min à 115°C. Les solutions mères d'acides aminés, vitamines et oligo-éléments sont stérilisées par filtration à l'aide de filtres Minisart 0,22 µm (sartorius). Les facteurs anaérobies sont ajoutés après la stérilisation des milieux.

d. Conditions de culture

i. Précultures aérobies

Les précultures des souches utilisées pour les tests d'activités antimicrobiennes de la PYO sont réalisées dans des Erlenmeyers (100 ml) contenant 20 ml de milieu, sous agitation rotative constante (180 rpm) à 30°C.

Les précultures de PA14 servant à l'inoculation des cultures liquides sont également réalisées dans des Erlenmeyers (100 ml) sous agitation rotative constante (250 rpm) à 37°C. Les volumes de culture occupent 1/5^{ème} de la capacité des Erlenmeyers.

ii. Cultures aérobies

Pour les cultures des tests d'activités antimicrobiennes de la PYO, les souches sont inoculées à une DO_{600nm} de 0,05 (trajet optique de 0,5 cm). Les cultures sont effectuées dans des microplaques (Greiner 24 puits) en présence ou non de PYO. La PYO est dissoute dans du méthanol. Un témoin permet de contrôler l'effet du méthanol sur la croissance. Les microplaques sont incubées à 30°C sous agitation constante (Table agitante).

L'inoculum pour les cultures de PA14 a été normalisé à une DO_{500nm} de 0,05 (trajet optique de 1 cm). Les volumes de culture occupent 1/5^{ème} de la capacité des Erlenmeyers. Les cultures de PA14 sont incubées sous agitation rotative constante (250 rpm) à 37°C.

iii. Suivi cinétique de PA14

Les suivis de croissance de souche PA14 WT et des différents mutants sont effectués durant 24 h. La DO_{500nm} est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre sur des aliquotes de 1

ml. Lorsque cela s'est avéré nécessaire ($DO_{500nm} > 0,6$) des dilutions ont été effectuées dans du milieu MOPS.

iv. Cultures hypoxies

Les cellules de PA14 sont cultivées sous agitation en hypoxie à 37°C dans des jarres anaérobies contenant des sachets générateurs d'hypoxie (CAMPYGENTM, Oxoid). L'obtention de l'hypoxie est vérifiée par virage de l'indicateur (Oxoid) du rouge au rose clair.

v. Précultures anaérobies

Des jarres anaérobies (jarre de 2 ou 8 litres) et des sachets générateurs d'anaérobiose (AnaeroGenTM, Oxoid) sont utilisés. Les précultures liquides incubées dans ces jarres sont effectuées dans des Erlenmeyers (50 ou 100 ml) contenant 20 ml de milieu de culture. Le virage de l'indicateur du rouge au blanc après 4 h d'incubation environ permet de vérifier que l'anaérobiose est bien atteinte.

vi. Cultures anaérobies

L'anaérobiose a été générée alternativement dans des jarres anaérobies, ainsi que dans des tubes Hungate.

Anaérobiose en jarres anaérobies

Les souches d'intérêt sontensemencées à une DO_{600nm} de 0,05 (trajet optique de 0,5 cm) et cultivées dans des microplaques (Greiner 24 puits) +/- PYO.

Les microplaques sont ensuite incubées pendant 48 h, dans des jarres anaérobies (jarre de 8 litres) en présence de sachets générateurs d'anaérobiose (AnaeroGenTM, Oxoid). L'anaérobiose est indiquée par virage de l'indicateur (Oxoid) et par la décoloration de la PYO après 5 h d'incubation environ.

Anaérobiose en tubes Hungate

Des tubes Hungate (15 ml) sont remplis avec 3 ml de milieu. Après inoculation de la suspension de levure ($DO_{600nm} = 0,05$), les tubes Hungate sont refermés. Deux aiguilles stériles sont plantées dans le septum des tubes. L'une d'elles permet de faire buller de l'argon dans le milieu lors de l'agitation au vortex afin de désaturer le milieu de son O_2 . La deuxième aiguille permet la purge des gaz excédentaires. Après 2 minutes de "bullage" intensif, la PYO est rajoutée tout en maintenant un faible flux d'argon. Un bullage additionnel d'argon de 2 minutes et 30 secondes est ensuite effectué puis les tubes sont incubés à 30°C sous agitation constante (table agitante), à l'obscurité pendant 24, 48 et 72 heures.

vii. Culture avec supplémentation en molécules antioxydantes

Au cours de notre étude, nous avons testé l'effet de plusieurs antioxydants sur la croissance des levures (WT-BY et W303) sur milieu YPD, YEPGly et YPD+FA (anaérobiose) en présence ou non de PYO.

Les antioxydants sont ajoutés à partir de solutions concentrées. Si l'antioxydant est dissout dans du méthanol, l'effet du solvant seul sur la croissance des levures est contrôlé.

Le **tableau 7** résume la manière dont les antioxydants sont préparés et la concentration finale à laquelle ils sont utilisés.

Tableau 7 : Antioxydants : préparation, conservation et concentrations finales usuelles.

Composé	Solvant	Solution stock	Conservation*	Concentration finale usuelle
L-ascorbate	eau	0,5 M	-20°C	10 mM
N-acétyl Cystéine (NAC)	eau	0,5 M	-20°C	5 mM
Resvératrol	méthanol	10 mM	-20°C	200 µM
Tiron	eau	100 mM	-20°C	1 mM

*Les solutions aqueuses ne sont conservées que quelques jours à -20°C.

viii. Culture avec supplémentation en catalase

Au cours de notre étude, nous avons également testé l'effet de l'ajout de catalase d'*Aspergillus niger* sur la croissance des levures (WT-BY, W303 et *yap1*) sur milieu YEPGly, en présence ou non de la PYO, ainsi qu'en présence ou non d'H₂O₂ (2 mM).

La catalase a été utilisée à 1000 unité /ml de culture comme testé par Muller (2002). La catalase d'*Aspergillus niger* (1 unité) est capable de décomposer 1 µ mole d'H₂O₂ par minute à pH 7,0. Dans nos conditions, la catalase a été utilisée à pH 5,5 (pH du milieu YEPGly).

3. Activité antimicrobienne de la PYO

a. Suivi de la multiplication cellulaire

Par la mesure de la densité cellulaire :

A l'issue de l'incubation de cellules, la turbidité est estimée par la mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (FLUO star Omega). À cette longueur d'onde, une unité DO correspond soit à environ $2 \cdot 10^7$ cellules pour les levures haploïdes, soit à environ 10^9 cellules pour les bactéries. Lorsque cela s'est avéré nécessaire ($DO_{600nm} > 0,6$) des dilutions ont été effectuées dans de l'eau physiologique (9 g/l NaCl).

b. Détermination de la viabilité cellulaire

Deux méthodes ont été utilisées pour la détermination de la viabilité cellulaire : la méthode de coloration au bleu trypan et la méthode d'étalement sur boîte de Pétri.

Méthode de coloration au bleu Trypan

La viabilité cellulaire peut être déterminée par mesure indirecte de la perméabilité des cellules mortes au bleu trypan (Alfenore et al., 2002). Le bleu trypan est un réactif chromophore, chargé négativement qui ne colore que les cellules endommagées, permettant de déterminer la viabilité d'un échantillon. Le milieu réactionnel, comprend un volume équivalent de culture et de bleu trypan (solution à 4 %). Une observation microscopique de la préparation est ensuite effectuée. Les cellules mortes apparaissent bleues tandis que celles qui sont viables restent incolores.

Méthode d'étalement sur boîte de Pétri

Les cellules sont diluées dans l'eau physiologique. 100 μ l sont étalés au râteau sur une boîte de Pétri contenant du milieu YPD. La viabilité cellulaire est déterminée par le comptage des colonies après 48 h d'incubation à 30°C. Pour chaque détermination, 2 essais sont réalisés.

c. Test des sondes fluorescentes pour le dosage des ROS

Sondes fluorescentes :

La détection rigoureuse des ROS intracellulaires n'est pas aisée. Il existe des données contradictoires quant à la possibilité d'utiliser des sondes fluorescentes classiques pour détecter les ROS en présence de PYO (O'Malley et al., 2004; Muller, 2006; Gloyne et al., 2011). Nous avons donc cherché à déterminer si les sondes Dihydrorhodamine 123 (DHR123) et 2',7'-dichlorofluorescéine diacetate (H₂DCF-DA) peuvent interagir avec la PYO (oxydée).

Protocole

Les essais sont effectués dans des microplaques (Greiner, 96 puits, noire). La fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Fluo Star Omega) dans les conditions suivantes : $\lambda_{\text{excitation}} = 485\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 520\text{nm}$.

Pour la mesure, nous avons ajouté dans la microplaque (un contrôle par ligne de microplaque) :

Contrôle 1 : Tampon Trizma pH 5,5

Contrôle 2 : Tampon Trizma pH 5,5 + sonde DHR123 (10 μM)

Contrôle 3 : Tampon Trizma pH 5,5 + PYO (100 μM)

Contrôle 4 : Tampon Trizma pH 5,5 + PYO (100 μM) + sonde DHR123 (10 μM)

Contrôle 5 : Tampon Trizma pH 5,5 + H₂O₂ 100 μM + sonde DHR123 (10 μM)

Contrôle 6 : Tampon Trizma pH 5,5 + H₂O₂ 100 μM + PYO (100 μM) + sonde DHR123 (10 μM)

La fluorescence est mesurée pendant 30 min à 30°C.

De même pour la sonde H₂DCF-DA (20 μM).

d. Dosages des produits de fermentation

Les dosages des produits de fermentation sont effectués sur les surnageants de culture filtrés à l'aide de filtres Minisart 0,22 μm (Sartorius) puis conservés à -20°C .

i. **Dosage du glucose et du glycérol par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP)**

La CLHP a été utilisée pour mesurer les concentrations de fin de culture en glucose glycérol, succinate et pyruvate. Le système chromatographique utilisé comprend :

- Un échantillonneur avec un injecteur automatique (Agilent 1200 series).
- Une pompe (Agilent).
- Un détecteur réfractométrique (RID, Watters 410 Packard).
- Un détecteur UV (Agilent)
- Un four thermostaté (Agilent)
- Un logiciel de contrôle, d'acquisition et de traitement des données (Agilent).

La colonne Rezex ROA (300 $\times$ 7,8 mm, Phenomenex), a été utilisée dans les conditions opératoires suivantes :

- élution avec de l'acide sulfurique 0,005 N à un débit constant de 0,5 ml/min
- volume d'injection : 5 μl

Les dosages ont été réalisés par étalonnage externe.

ii. **Dosage de l'éthanol par chromatographie en phase gazeuse (CPG):**

Le dosage de l'éthanol dans les surnageants de culture a été réalisé par CPG. Le chromatographe HP5890 série 2 utilisé à cette fin est équipé d'un injecteur-diviseur, d'une colonne OV 1701 (25 m $\times$ 0,25 mm i.d. $\times$ 0,25 μm , Chrompack, France) et d'un détecteur à ionisation de flamme. L'injecteur est maintenu à 220°C et le détecteur à 250°C . La colonne

est utilisée en isotherme à 50°C pendant 15 min. L'azote est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 2 mL.min⁻¹ dans la colonne. Le taux de partage entre débit de fuite et colonne est de 43/2. Des débits d'hydrogène de 38 mL.min⁻¹ et d'air de 398 mL.min⁻¹ sont fournis au détecteur.

Le dosage de l'éthanol est réalisé par étalonnage interne en utilisant le 1-propanol comme étalon interne.

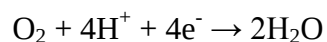
e. Mesure des spectres d'absorption de la PYO

La mesure des spectres d'absorption de la PYO (200-700 nm) a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (FLUO star Omega) sur deux échantillons : PYO incubée 24 h en anaérobie à 30°C, et PYO diluée dans du surnageant de culture. Le pH de deux échantillons a été contrôlé avant la mesure des spectres.

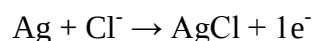
4. Mesure de la vitesse de consommation d'O₂

a. L'électrode de mesure (électrode de Clark)

Il s'agit d'un système comprenant une cathode (électrode positive) en platine (Pt) ou en or entourée d'une anode (électrode négative) en argent (Ag). La cathode est en contact étroit avec la membrane semi-perméable de tefcel (dérivé du téflon). L'oxygène diffuse à travers elle, et est réduit en H₂O au niveau de la cathode maintenue à un potentiel extrêmement négatif (-300 mV) :



Le circuit se termine au niveau de l'anode en argent qui est lentement oxydée en contact de la solution d'électrolyte (solution de KCl demi-saturée) :



La vitesse de transfert d'e⁻ dans le système (« pile électrique »), et donc l'intensité et la tension électrique, sont proportionnels à la vitesse de diffusion de l'O₂ au travers de la

membrane, elle-même proportionnelle à la concentration d'O₂ dans la chambre (Loi de diffusion de Henry).

Ce processus dépend, de la distance de diffusion entre le milieu d'expérience et l'électrode. Cependant d'autres facteurs entrent en jeu comme la température, la viscosité du milieu d'expérience, l'épaisseur et la perméabilité de la membrane, la vitesse de rotation du barreau magnétique.

La réduction de l'O₂ en H₂O est un processus qui consomme lui-même de l'O₂. Ceci signifie que le signal du flux d'O₂ mesuré représente la somme des consommations du système de mesure (électrode) et du système biologique (suspension bactérienne ou de levures). En oxygraphie haute résolution, il est possible de quantifier la consommation d'O₂ par l'électrode et d'en tenir compte pour la mesure des flux biologiques d'O₂.

b. L'oxygraphe "classique"

Pour des mesures rapides de consommation d'O₂ sur un grand nombre d'échantillons, nous avons utilisé quatre oxygraphes "classiques" montés en série. Une des quatre cuves est présentée sur le **schéma 23**. La sonde à O₂ est immergée dans une chambre de mesure entourée d'un bain thermostaté à 30°C. Un bouchon capillaire permet l'addition de substances diverses *via* une seringue Hamilton tout en maintenant l'isolation de la chambre. Le volume efficace est de 2 ml pour chaque essai.

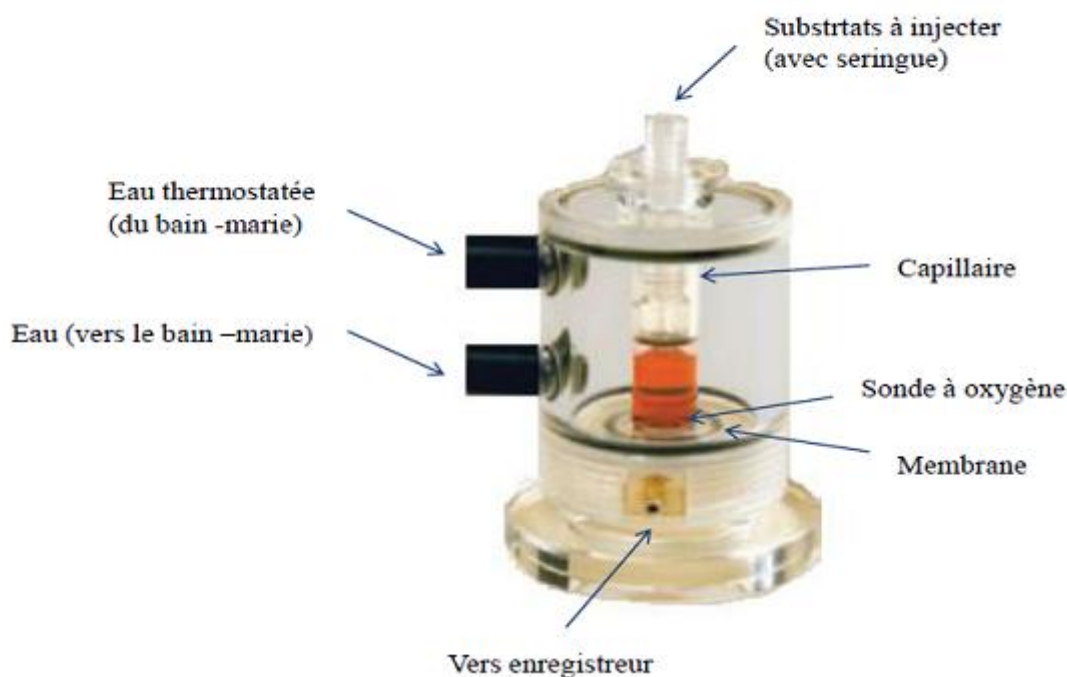


Schéma 23 : Dispositif "classique" de mesure de la consommation d'O₂.

c. L'oxygraphe haute résolution O₂K-Oroboros

L'oxygraphe 2K haute résolution d'Oroboros Instruments (Innsbrück, Autriche) que nous avons utilisé, est composé d'une unité de mesure (deux chambres réactionnelles) et d'une unité de contrôle. L'unité de contrôle, est un bloc électronique nous permettant de régler certains paramètres expérimentaux tels que la vitesse de rotation des barreaux magnétiques, la température d'incubation. C'est également dans cette unité de contrôle que sont traitées les informations transmises par l'unité de mesure. L'unité de mesure est un monobloc dans lequel deux chambres de mesure en verre (duran polished glass) sont placées l'une à côté de l'autre mais thermiquement isolées par une couche de polystyrène expansé (**Schéma 24**). Chaque chambre est en contact à sa base avec une électrode à oxygène type «électrode de Clark». Le milieu d'expérimentation est agité par un barreau magnétique entouré de polyéthylène (PEEK) mu par quatre électro-aimants placés sous la base de chaque

chambre en verre. Un thermorégulateur ou thermostat de haute précision à effet peltier permet un contrôle précis et constant de la température d'expérimentation.

Les chambres sont scellées par deux pistons dont le fond est constitué de titane et possédant en leur centre un orifice capillaire. Ceci permet d'obtenir un espace fermé dans lequel on peut tout de même injecter les substrats et les inhibiteurs grâce à des seringues de haute précision (seringues de Hamilton). Les vitesses brutes de consommation de l'O₂ (pmoles O₂/sec⁻¹) sont données par le logiciel d'utilisation de l'appareil, DataXLab.

Puisque la consommation d'O₂ par l'électrode et les micro-entrées d'O₂ dans le système peuvent être quantifiées, respectivement en normoxie et hypoxie sévère, ce système haute résolution permet l'analyse de très faibles flux de consommation d'O₂ et des mesures à de très faibles tensions en O₂ de l'ordre du µM.

Les caractéristiques de l'appareil O₂K-Oroboros ainsi les instructions concernant son utilisation sont disponibles sur le site (<http://www.orooboros.at/>).



Schéma 24: L'oxygraphe 2 K hautes résolutions d'Oroboros Instruments.

d. Calibration des flux d'oxygène

La calibration du système, c'est-à-dire la détermination de ses propriétés de base, doit être effectuée aussi fréquemment que possible.

i. Saturation totale en O₂

Pour déterminer la concentration en O₂ correspondant au "100 %" de saturation de milieu en O₂, la solubilité de l'O₂ dans les conditions expérimentales doit être définie. La solubilité de l'O₂ en solution aqueuse est fortement dépendante de la température, de la pression atmosphérique et de la force ionique de la solution dans la chambre de mesure. Des normogrammes sont disponibles pour déterminer la solubilité de l'O₂ atmosphérique dans l'eau ou des solutions salines en équilibre avec une atmosphère de composition standard.

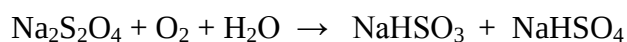
Après calibration, les valeurs de la concentration en O₂ données par l'oxygraphe doivent s'approcher des valeurs théoriques à disposition.

La calibration réalisée sur le tampon de mesure saturé en O₂ de l'air permet de déterminer le « 100 % » de saturation en O₂ à la température de travail.

ii. Calibration à 0 % en O₂

Plusieurs méthodes sont à disposition pour effectuer une calibration 0 %, comme par exemple l'utilisation de produits chimiques tels que le dithionite de sodium, l'utilisation de l'argon (Ar), gaz inerte lourd qui se substitue à l'O₂ dans la chambre d'expérimentation.

En oxygraphie classique, le « 0 % O₂ » a été déterminé en ajoutant un excès de cristaux de dithionite Na₂S₂O₄ (réducteur puissant).



En oxygraphie haute résolution, nous avons opté pour une autre méthode pour effectuer la calibration 0 %. Nous avons introduit 2 ml d'une suspension concentrée de cellules (levures ou bactéries) dans la chambre de mesure. Après avoir bouché les cuves,

l'anaérobiose est atteinte relativement rapidement dans les cuves. Le « 0 % O₂ » est déterminé après plusieurs minutes pour s'assurer de stabilité du signal.

e. Mesure de flux spécifique de consommation d'O₂ (JO₂)

Le flux (J) de consommation d'O₂ est mesuré à 30°C (levures et bactéries) et à 37°C (PA14). Le flux spécifique de consommation d'O₂ est calculé à partir d'une vitesse brute correspondante à un régime stationnaire. Le JO₂ spécifique est exprimé en fonction de la densité optique (uDO_{600nm}) donc en en pmol.sec⁻¹.uOD_{600nm}⁻¹.

i. Mesure de JO₂ des souches d'intérêt (levures et bactéries)

JO₂ des cellules en culture

Les mesures de JO₂ sont effectuées en présence ou non de PYO sur des cellules resuspendues dans leur propre surnageant. Le surnageant est obtenu par centrifugation de cellules à 5000 g pendant 15min.

JO₂ des cellules lavées "resting cells"

Après culture en aérobie, les cellules sont centrifugées (15min à 5000 g) et lavées 2 fois (10 et 5min à 5000 g) avec 2 ml du tampon Trizma (pH5,5) dans le cas des levures et du tampon A (pH 7,0) dans le cas des bactéries. Les cellules sont finalement remises en suspension dans du tampon trizma ou du tampon A. Les mesures de JO₂ sont effectuées en présence ou non de PYO sur des cellules lavées resuspendues dans le tampon correspondant en présence ou non de succinate ou de glucose.

ii. Mesure de JO₂ de PA14

JO₂ des cellules en culture

Les mesures de JO₂ sont effectuées en présence ou non de PYO sur de cellules resuspendues dans le surnageant de culture obtenus par centrifugation (20 min à 5000 g).

JO₂ des cellules lavées (resting cells)

Après culture et récolte en phase stationnaire, les cellules de PA14 sont centrifugées (15min à 5000 g) et lavées 2 fois avec 2 ml du tampon phosphate (100 mM, pH6,8). Les cellules sont finalement remises en suspension dans du tampon phosphate. Les mesures de JO₂ sont effectuées en présence ou non de PYO sur de cellules lavées resuspendues dans du tampon phosphate en l'absence ("JO₂ endogène") ou en présence de succinate.

iii. Mesure de JO₂ de mitochondries de *S. cerevisiae*

Les mitochondries de levure utilisées pour cette étude ont été fournies par Stephen Manon (IBGC Bordeaux). Elles ont été obtenues à partir de la souche WT-W303 cultivée en aérobiose sur milieu YEP additionné d'adénine (100 mg.L⁻¹) et 2% (w/v) de lactate. Ce substrat permet en effet la production de cellules comportant de nombreuses mitochondries. Les cellules ont été récoltées en milieu de phase exponentielle de croissance. Les mitochondries ont été isolées suivant la procédure décrite par Avéret et al. (1998). Les protéines mitochondriales ont été quantifiées par la méthode de Biuret en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard. Pour les mesures de respiration, les mitochondries ont été resuspendues à une concentration de 0,1 mg protéine.ml⁻¹ dans le tampon suivant : mannitol 0.65M, EGTA 0.36mM, Tris/maleate 10mM (pH 6.7), BSA 0.3% (w/v).

iv. Utilisation des effecteurs et inhibiteurs du JO₂

Au cours de notre étude, nous avons testé l'effet de plusieurs substances effectrices ou inhibitrices de la respiration. Celles-ci sont généralement ajoutées à l'aide de seringues Hamilton à partir de solutions concentrées (×200 environ). Les volumes ajoutés varient de 1 à 25 µl (pour 2 ml final). Si la substance est dissoute dans un solvant organique (méthanol, éthanol), l'effet du solvant seul sur le JO₂ est contrôlé. Le **tableau 8** résume la manière dont les substances sont préparées et la concentration finale à laquelle elles sont généralement utilisées.

Tableau 8 : Inhibiteurs et effecteurs potentiels de la consommation d'O₂ : préparation, conservation et concentrations finales usuelles.

Composé	Solvant	Solution stock	Conservation	Concentration finale usuelle
Inhibiteurs de la chaîne respiratoire				
Roténone	méthanol	5 mM	-20°C	5 µM
TTFA	méthanol	20 mM	-20°C	250 µM
Antimycine A	méthanol	10 mM	-20°C	10 µM
Myxothiazol	méthanol	10 mM	-20°C	10 µM
Atovaquone	méthanol	1 mM	-20°C	5 µM
Ascochlorin	méthanol	2 mM	-20°C	10 µM
HQNO	méthanol	10 mM	-20°C	25-40 µM
Piericidin A	méthanol	2,67 mM	-20°C	30 µM
KCN	eau distillée		non	0,3-1 mM
Substrats et donneur d'électrons				
NADH	eau distillée	100 mM	non	1 mM
D-glucose	eau distillée	1 M	-20°C	1-10 mM
lactate	eau distillée	1 M	-20°C	1-10 mM
Pyruvate	eau distillée	1 M	non	1-10 mM
Succinate	eau distillée	1 M	-20°C	1-10 mM

5. Préparation des cellules perméabilisées de PA14

Les cellules perméabilisées de PA14 sont obtenues en utilisant la méthode de Watson et al. (1983) que nous avons légèrement modifiée.

Les cellules de PA14 sont récoltées en phase stationnaire de croissance (après 14 h de culture) et lavées deux fois avec du tampon KE. Elles sont ensuite remises en suspensions dans le tampon KE de façon à obtenir une DO_{600nm} égale à 2. La perméabilisation est initiée par l'addition de toluène (1 %). La suspension cellulaire est alors homogénéisée (vortexage 1min). Les cellules perméabilisées sont récoltés (15min à 5000 g) et lavées deux fois dans 2

ml tampon phosphate (100 mM, pH 6,8). Les cellules sont finalement remises en suspension dans 1 ml du tampon phosphate.

6. Préparation des sphéroplastes

Les sphéroplastes de PA14 sont obtenus par la méthode décrite par (Yeterian et al., 2010).

Les cellules de PA14 sont récoltées en phase stationnaire de croissance et lavées deux fois avec 2 ml tampon Tris-HCl, pH 8,0. Elles sont ensuite resuspendues dans 1 ml tampon (200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 % sacccharose). La digestion des membranes cellulaires est initiée par l'addition de 10 μ l de lysozyme (de blanc d'œuf, Sigma) à 100 mg/ml. La suspension cellulaire est ainsi incubée à température ambiante sous agitation douce. Après 40 minutes d'incubation, les sphéroplastes sont récoltés (15 min à 8000 g) et lavés deux fois avec du tampon phosphate. Les sphéroplastes sont finalement remis en suspension dans du tampon phosphate.

7. Mesure du taux de réduction de la PYO par PA14

Les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées par l'équipe de Dianne Newman (Caltech, Californie, USA) dans la cadre d'une collaboration.

La mesure du taux de réduction de la PYO est réalisée après 14 ou 16 h de culture pour les différents mutants de PA14. Dans des microplaques (96 puits), 100 μ L de culture sont mélangés avec 100 μ l de milieu de culture frais et 100 μ M de PYO. La cinétique de réduction de PYO est suivie en anaérobie par la mesure de la fluorescence $\lambda_{\text{excitation}} = 330$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 490$ nm à l'aide d'un spectrofluorimètre placé dans une chambre anaérobie. La mesure de fluorescence est réalisée chaque 1,5 min pendant 30 min.

Résultats et Discussion

Chapitre 1 :
Étude de la toxicité de la pyocyanine envers
***S. cerevisiae* : un modèle de cellule eucaryote.**

1. Intérêt de la levure pour l'étude de la toxicité de la PYO

a. Particularités de *S. cerevisiae*

Pour clarifier les mécanismes d'action de la PYO, de nombreuses études ont été menées sur des cellules eucaryotes notamment des cellules épithéliales de poumon mais très peu sur des cellules de levure hormis *C. albicans*. A notre connaissance, seuls Ran et al. (2003) puis Angell et al. (2006) ont utilisé *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote pour identifier de nouvelles cibles de la PYO. Or cette stratégie présente plusieurs avantages.

En effet, la levure *S. cerevisiae* peut être manipulée facilement d'un point de vue génétique. En utilisant diverses techniques de biologie moléculaire, il est très aisé de générer une mutation sur un des chromosomes, voire même de supprimer un gène entier et générer ainsi des mutants permettant de mettre en évidence l'importance d'une protéine dans la résistance ou la sensibilité à la PYO. De plus, environ 40 % des protéines du protéome levurien présentent une séquence en acides aminés offrant une certaine homologie avec celle des protéines humaines. La levure a ainsi été utilisée comme modèle pour la biologie cellulaire fondamentale et la compréhension de mécanismes impliqués dans des maladies telles que les cancers ou les maladies mitochondriales.

De plus, l'une des particularités métaboliques de *S. cerevisiae* est d'être capable de vivre en présence (aérobiose) ou en absence (anaérobiose) d'oxygène moléculaire (O_2). D'où l'intérêt d'utiliser *S. cerevisiae* pour étudier l'effet de la PYO à différentes tensions en O_2 .

La levure possède également une très grande plasticité métabolique : elle peut croître en respiration pure aux faibles concentrations en glucose (environ 1 g/l) et sur des substrats non fermentescibles (glycérol, éthanol, lactate, succinate...). A l'inverse, en anaérobiose son métabolisme est purement fermentaire, la respiration anaérobie étant impossible chez ce microorganisme. Enfin, la levure est Crabtree-positive et sous l'effet de la répression catabolique par le glucose, elle peut respiro-fermenter en aérobiose sur glucose (20 g/l).

Les études menées au préalable sur les effets de la PYO sur *S. cerevisiae* peuvent cependant être sujettes à caution. En effet, Ran et al. (2003) puis Angell et al. (2006) ont utilisé la souche BY4741, souche affectée dans la respiration. Cette souche porte une mutation (insertion Ty) sur le gène *hap1* codant pour un facteur de transcription clé impliqué dans la régulation complexe de l'expression des gènes en réponse à l'O₂ (Gaisne et al., 1999). Les effets liés à la respiration ont donc pu être sous-estimés. A l'inverse, les effets pro-oxydants de la PYO ont peut-être été surestimés en utilisant des sondes fluorescentes (Ran et al., 2003).

La détection de ROS en présence de la PYO (molécule redox active) est particulièrement difficile. Les travaux d'O'Malley et al. (2004) ont montré que les sondes fluorescentes telles la dichlorofluoresceine diacétate (H₂DCFDA), la 5 et 6 carboxy-2',7'-diclorodihydrofluoréine (5&6 CDCFH₂) et la dihydrorhodamine 123 (DHR 123) peuvent réagir directement avec la PYO. Cependant, lors d'une étude récente Gloyne et al. (2011) ont utilisé la sonde H₂DCFDA pour détecter l'H₂O₂ produit consécutivement à l'ajout de PYO dans les cellules épithéliales de poumon. Nous avons donc tout d'abord vérifié si les sondes H₂DCFDA et DHR 123 peuvent être utilisées pour détecter les ROS en présence de la PYO.

b. Utilisation de sondes fluorescentes avec la PYO

Une fluorescence intense a été observée lorsque la sonde DHR 123 est mise en contact avec la PYO (**Figure 25**). Des résultats similaires ont été obtenus avec la sonde H₂DCFDA déacétylée par incubation avec NaOH (10 mM) pendant 60 minutes (**données non montrées**). Ces sondes fluorescentes ne peuvent donc pas être utilisées pour la détection de ROS en présence de PYO. Ces données remettent également en cause certains travaux publiés sur les effets pro-oxydants de la PYO et plus particulièrement les travaux de Ran et al. (2003).

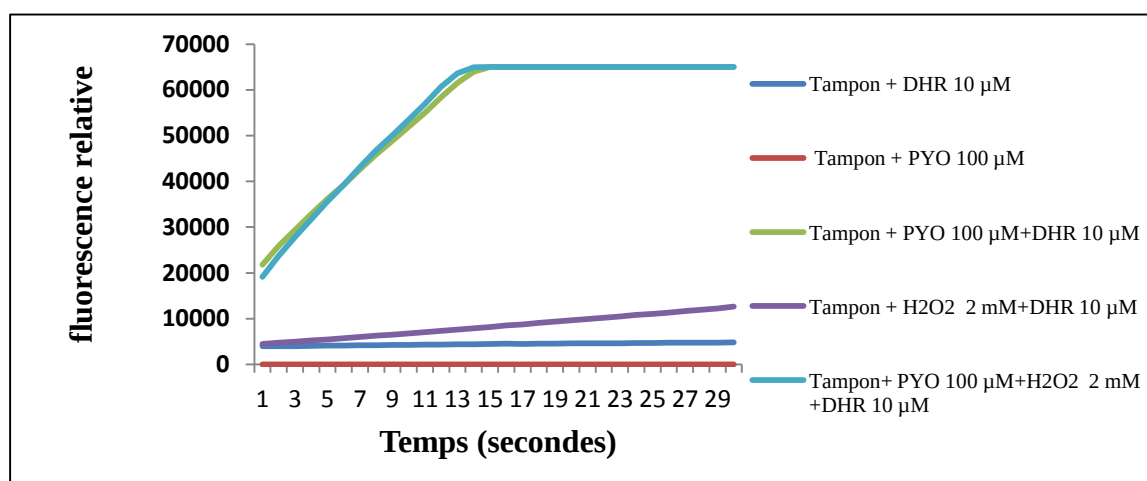


Figure 25: Réaction de la sonde DHR123 (10 µM) avec la PYO (100 µM).

c. Phénotypes des souches utilisées

Nous avons donc réexaminé l'activité antimicrobienne de la PYO envers *S. cerevisiae*. Nous avons utilisé la souche sauvage W303 dont la respiration n'est pas affectée. Nous avons réexaminé le fond génétique BY en utilisant une souche WT-BY4742 restaurée pour la protéine hap1p. De plus, nous avons utilisé des mutants affectés (i) dans la respiration ou la biosynthèse d'hème (*rho*^o, *hem1*, *erg1*) (ii) dans la production de NADPH (*zwf1*). Afin de déterminer si le stress oxydatif est impliqué ou non dans la toxicité de la PYO, nous avons également privilégié l'utilisation de mutants de *S. cerevisiae* affectés dans la résistance au stress oxydatif (*yap1*, *skn7*, *ctt1*, *sod1*). Toutes ces souches dérivent de la souche BY4742. Elles ont été construites dans le cadre de cette étude ou obtenues auprès de l'IBGC-CNRS de Bordeaux (M. Stephen Manon) et de la société EUROSCARF.

Les principales caractéristiques des souches utilisées sont présentées dans le **Tableau 9**. Les phénotypes des mutants simples ne sont décrits que partiellement dans les bases de données (<http://www.yeastgenome.org>) pour des conditions simples (milieu YPD en aérobie). Les mutants particuliers que nous avons construits ont donc été caractérisés en termes de croissance aérobie (sur milieux YPD, YEPGly et SM) et anaérobie (YPD+FA).

Tableau 9 : Description des principales souches de levure *S. cerevisiae* utilisées dans cette étude (ORF délété et fonction cellulaire affectée).

Nom de la souche	ORF délété	Protéine et fonction cellulaire affectée (localisation)
WT-BY4742	Souche de référence	Régulation O ₂ -dépendante des gènes perturbée=> Respiration partiellement altérée.
WT-BY4742 restaurée	Souche de référence	-----
WT-W303	Souche de référence	-----
<i>zwf1</i>	YNL241c	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (voie des pentoses phosphates) => diminution de la production du NADPH.
<i>rho</i> ^o	ADN mitochondrial	Absence d'ADN mitochondrial => Absence de respiration.
<i>yap1</i>	YML007w	Facteur de transcription à domaine leucine Zipper (transite au noyau sous stress oxydatif) => Faible résistance au stress oxydatif.
<i>sod1</i>	YJR104c	Cu-Zn superoxyde dismutase (cytosol et espace intermembranaire) => Diminution de la résistance au stress oxydatif (surtout à l'anion superoxyde O ₂ ⁻).
<i>ctt1</i>	YGR088w	Catalase T cytosolique => Diminution de la résistance au stress oxydatif.
<i>skn7</i>	YHR206w	Facteur de transcription nucléaire impliqué dans la réponse au stress oxydatif => Faible résistance au stress oxydatif.
<i>hem1</i>	YDR232w	5-aminolévulinate synthase nécessaire pour la biosynthèse d'hème (matrice mitochondriale) => Absence de respiration. Absence de synthèse d'acides gras insaturés et de stérols. Absence de régulation hème-dépendante des gènes et absence de catalase fonctionnelle.
<i>erg1</i>	YGR175c	Diminution de la résistance au stress oxydatif Squalène époxydase (R.E., gouttelettes lipidiques), première étape de la synthèse aérobie des stérols => Absence de synthèse de stérols. Ne peut pas se développer en aérobie.

Les mutants dérivent directement de la souche haploïde WT-BY4742 Mata.

Les phénotypes de croissance ont été vérifiés à l'aide de cultures liquides sur microplaques ou en tubes Hungate (**données non montrées**). Les résultats ont été ceux attendus. Le mutant *rho*^o ne peut pas respirer et se développer sur glycérol (YEPGly). Le mutant *erg1* est incapable de synthétiser des stérols et ne se développe qu'en anaérobiose stricte en présence d'ergostérol et d'acides gras insaturés (Rosenfeld et Beauvoit, 2003). Ce mutant a été utilisé comme contrôle d'anaérobiose lors de la culture en tubes Hungate. Le mutant *hem1*, incapable de synthétiser le précurseur de l'hème, le δ -aminolévulinate (δ -ALA), donc incapable de synthétiser des cytochromes, ne peut ni respirer ni synthétiser des stérols et des acides gras. La synthèse de ces lipides nécessite les cytochromes *b*₅ et P450. Nous avons vérifié que la croissance respiratoire du mutant *hem1* est restaurée en présence de δ -ALA 40 mg/l.

Nous avons également caractérisé chaque mutant en situation de stress oxydatif induit par l' H_2O_2 (2 mM).

d. Sensibilité des souches utilisées à l' H_2O_2

La sensibilité des souches à l' H_2O_2 (2 mM) a été évaluée par des tests en cultures liquides sur microplaques. Les résultats obtenus sur milieu YPD en aérobiose sont présentés **figure 26**. Ils mettent en évidence l'hypersensibilité des mutants *yap1*, *skn7* et *hem1*. Le mutant déficient respiratoire *rho*^o est aussi sensible à l' H_2O_2 comparativement à WT-BY, bien qu'il le soit moins que *yap1*, *skn7* et *hem1*. En effet, le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est requis pour une résistance optimale au stress oxydatif. Le mutant *sod1*, affecté dans la production de superoxyde dismutase cytosolique mais équipé de catalases est logiquement très peu sensible à l' H_2O_2 . De façon surprenante, le mutant *ctt1* (mutant affecté dans la synthèse de la catalase T cytosolique) est très peu sensible à l' H_2O_2 . Ce résultat pourrait être dû au fait que la levure peut compenser l'absence de catalase cytosolique par d'autres enzymes antioxydantes tel que les peroxydases et la catalase A (Van Zanduycke et al., 2002).

La concentration en H_2O_2 utilisée (2 mM) est une concentration qui reste modérée pour mettre en évidence les souches faiblement sensibles à l' H_2O_2 .

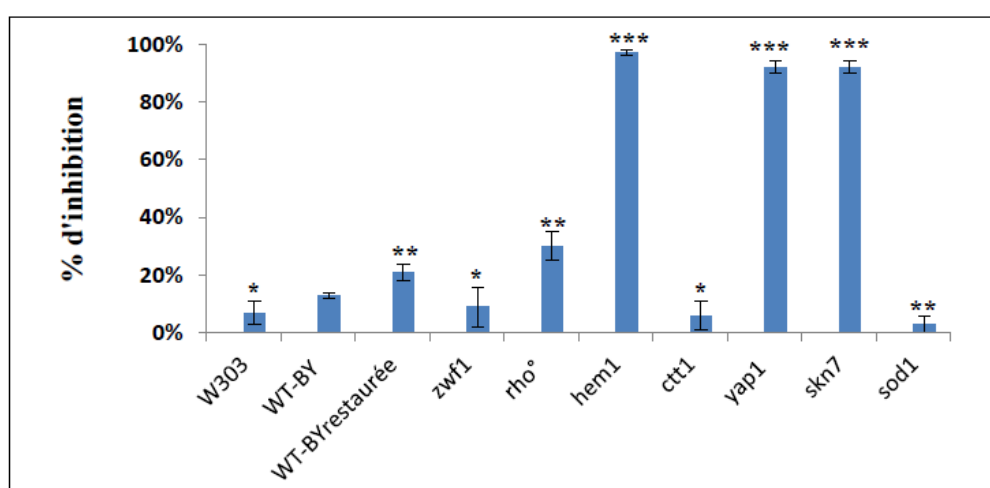


Figure 26: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, WT-BY restaurée, et des mutants de WT-BY par l' H_2O_2 (2 mM) sur milieu YPD en aérobie (24 h de culture). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

En culture aérobie sur glucose 20 g/l (YPD), les levures sont en respiration. La sensibilité des souches à l' H_2O_2 (2 mM) a également été déterminée en respiration pure sur glycérol (YEPGly). Toutes les souches testées présentent une sensibilité plus importante à l' H_2O_2 sur milieu YEPGly comparativement au milieu YPD, excepté les mutants *yap1* et *skn7* déjà hypersensibles à l' H_2O_2 sur YPD (**Figure 27**).

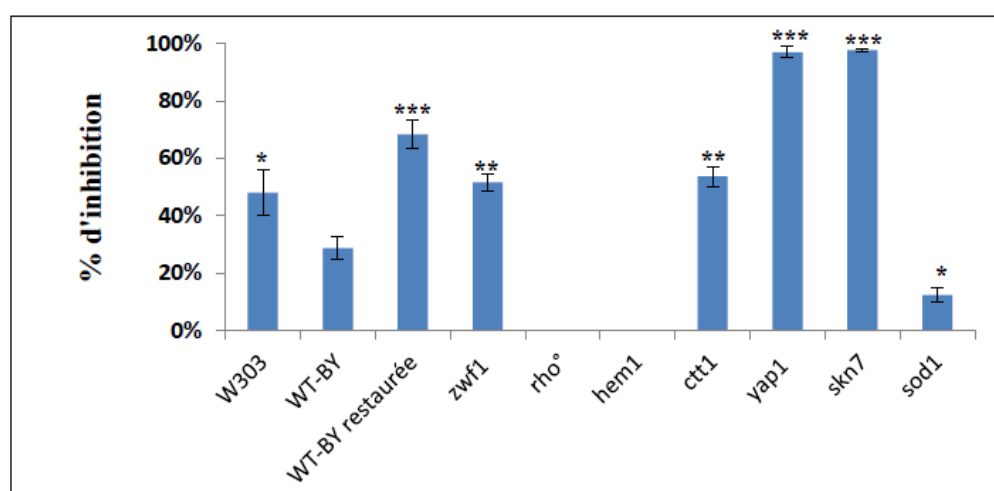


Figure 27: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, WT-BY restaurée, et des mutants par l' H_2O_2 (2 mM) sur milieu YEPGly en aérobie (48 h de culture). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Nous avons également testé la sensibilité des différentes souches à l' H_2O_2 sur milieu minimum (SM, glucose 10 g/l). Logiquement, toutes les souches testées ont montré une hypersensibilité à l' H_2O_2 sur milieu SM (en aérobiose) (**Figure 28**) comparativement au milieu YPD. En effet, sur milieu SM, les besoins en NADPH et ATP pour les synthèses protéiques sont accrus ce qui diminue la capacité de lutte contre le stress oxydatif. Cette hypothèse a déjà été formulée par Hassan et Fridovitch (1980) pour expliquer la plus grande sensibilité à un stress oxydatif sur milieu défini.

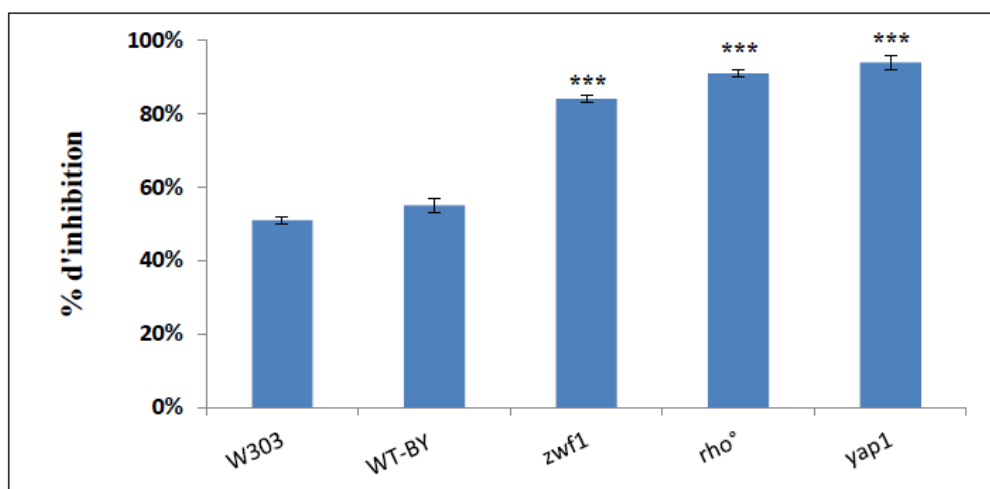


Figure 28: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, et des mutants par l' H_2O_2 (2 mM) sur milieu SM en aérobiose (48 h de culture). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$.**

Enfin, nous avons testé la sensibilité des souches sauvages W303, WT-BY et du mutant *yap1* à l' H_2O_2 sur milieu YPD+FA en anaérobiose. La **figure 29** montre que le mutant *yap1* est également hypersensible à l' H_2O_2 en anaérobiose.

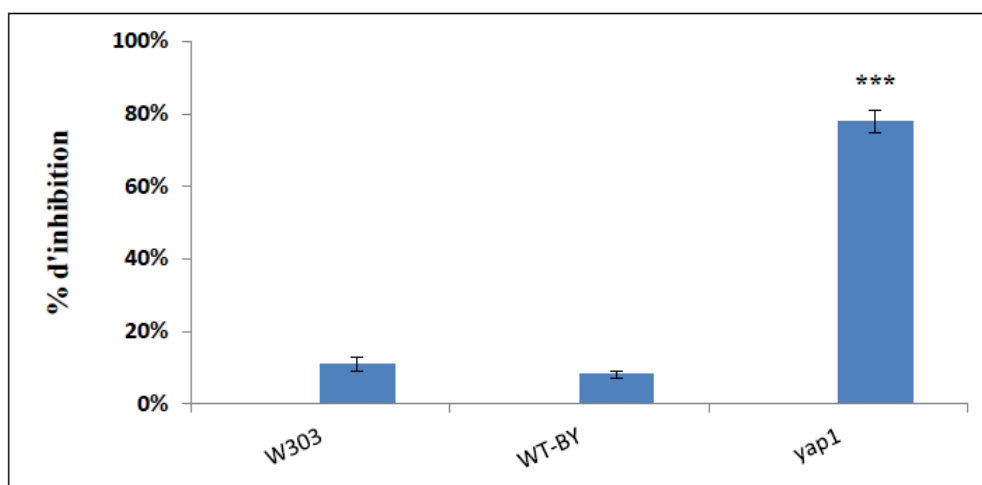


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY et du mutant *yap1* par l' H_2O_2 (2 mM) sur milieu YPD+FA en anaérobiose (jarres d'anaérobioses, 48 h de culture). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$.**

2. Effet de la PYO sur la croissance de *S. cerevisiae*

Après avoir caractérisé la sensibilité des mutants à l' H_2O_2 , le premier véritable objectif de notre travail a été de caractériser chaque mutant en terme de sensibilité à la PYO dans différentes conditions : milieux riches, métabolismes respiro-fermentaire (YPD) ou respiratoire (YEPGly), et milieu minimum (SM). Nous avons également évalué cette toxicité en anaérobiose. En effet, plusieurs auteurs ont suggéré que *Pa* se développe en micro-aérobiose ou en anaérobiose lorsqu'elle vit en biofilm (Worlitzsch et al., 2002; Yoon et al., 2002) notamment lorsque des patients atteints de mucoviscidose sont infectés chroniquement. Or très peu d'études ont examiné l'effet de la PYO en anaérobiose et toutes ces études ont porté sur la toxicité de la PYO vis-à-vis de bactéries (Baron et Rowe., 1981; Baron et al., 1989).

La sensibilité des souches à la PYO a été évaluée par des tests en cultures liquides sur microplaques.

A. Sensibilité à la PYO en aérobie

a. Sur milieu YPD

La sensibilité à la PYO des souches sauvages W303, WT-BY et des mutants est présentée **figure 30**. Nous constatons tout d'abord que *S. cerevisiae* présente une résistance relativement importante à la PYO sur milieu YPD en aérobie. Les pourcentages d'inhibition pour des concentrations en PYO de 250 et 100 μM sont très faibles. Il a été montré que pour des cellules eucaryotes telles les cellules épithéliales de poumon, une concentration $\geq 25 \mu\text{M}$ de PYO suffit à induire l'apoptose (Muller, 2006) et que chez les bactéries des concentrations de l'ordre de 100 μM sont inhibitrices (Hassan et Fridovich, 1980). Chez la levure, la sensibilité reste faible même à 500 μM de PYO. Nos résultats sont cependant en accord avec les travaux de Ran et al. (2003) et ceux de Kerr et al. (1999) qui ont utilisé une concentration en PYO de l'ordre 100 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 476 \mu\text{M}$) respectivement pour observer un effet inhibiteur de la PYO avec *S. cerevisiae* et *Candida albicans*. Ces résultats peuvent être expliqués par :

(i) l'imperméabilité des parois de levure à la PYO

(ii) l'implication/l'existence de pompes d'efflux permettant à *S. cerevisiae* de rejeter la PYO. Cette hypothèse sera examinée ultérieurement.

(iii) l'effet Crabtree (Deken, 1966; Rodrigues et al., 2006). En effet, en aérobie, lorsque la concentration en glucose est supérieure à une valeur critique (de l'ordre de 1 à 5 g/l), *S. cerevisiae* adopte un métabolisme respiro-fermentaire. Dans nos conditions de culture (YPD+O₂, glucose 20 g/l), la levure est soumise à des niveaux très importants de répression catabolique pendant la phase de croissance. Or, Baron et Rowe (1981) ont suggéré que la toxicité de la PYO dépend de la respiration et que la fermentation est une voie métabolique qui permet de minimiser la toxicité de PYO chez les bactéries. Il est donc possible que la faible toxicité observée soit due à la prépondérance de la fermentation dans les conditions que nous avons utilisées.

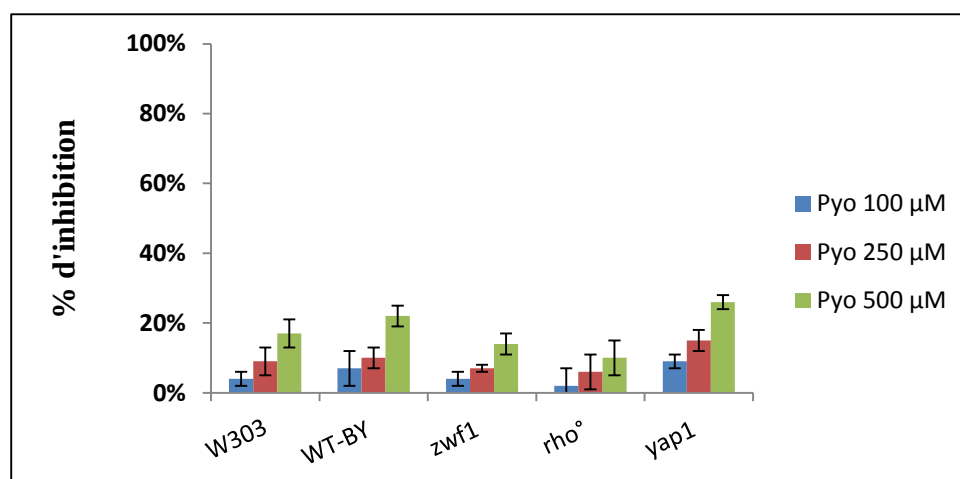


Figure 30: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, et des mutants par la PYO : 100, 250 et 500 μ M sur milieu YPD en aérobie (24 h de culture).

Puisque la toxicité de la PYO est observée pour de fortes concentrations (500 μ M), nous avons utilisé cette concentration pour la suite de ce travail sur la levure *S. cerevisiae*.

Les résultats obtenus avec une concentration en PYO de 500 μ M sur milieu YPD en aérobiose sont présentés **figure 31**. Les mutants affectés dans la résistance au stress oxydatif (*yap1*, *ctt1*, *sod1* et *hem1*) sont plus sensibles à la PYO que la souche parentale WT-BY et les autres mutants. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ran et al. (2003) qui ont suggéré l'implication du stress oxydatif dans la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae*. Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence car les inhibitions restent faibles.

Le mutant déficient respiratoire *rho*[°], est résistant à la PYO et la souche sauvage WT-BY restaurée est plus sensible que la souche WT-BY non restaurée. Ces deux résultats suggèrent qu'une moindre respiration induirait une moindre toxicité de la PYO. Ils pourraient être expliqués par l'hypothèse formulée par Baron et al. (1981 et 1989) qui ont proposé que l'activité antimicrobienne de la PYO résulte de son interaction avec la chaîne respiratoire de la cellule cible. La fermentation permettrait de minimiser la toxicité de la PYO (Baron et Rowe., 1981).

A ce stade, nous pouvons supposer que plusieurs mécanismes (stress oxydatif, interaction avec la chaîne respiratoire, voire un autre mécanisme) sont impliqués dans la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae* en aérobie.

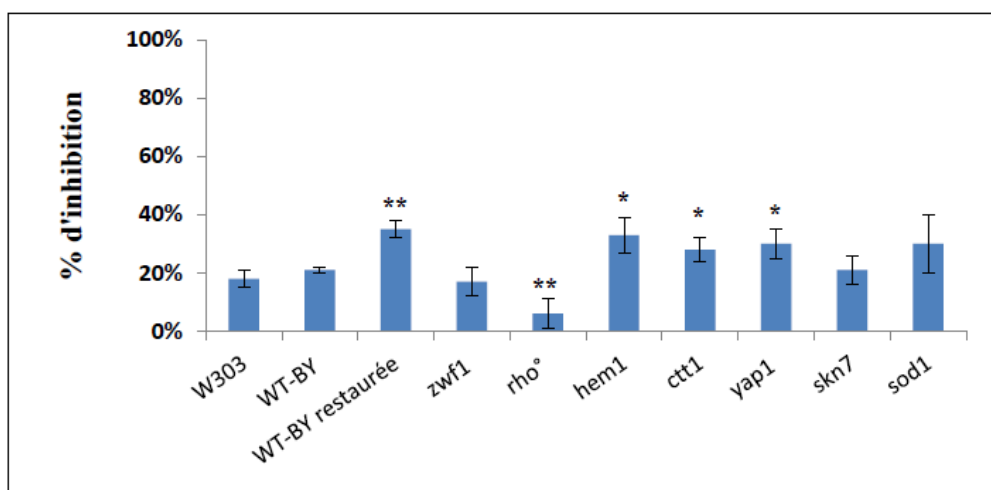


Figure 31: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, WT-BY restaurée et des mutants par la PYO 500 μ M sur milieu YPD en aérobie (24 h de culture). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$.**

b. Sur milieu YEPGly

Si la PYO exerce sa toxicité *via* la respiration (ou *via* le stress oxydatif), son effet devrait augmenter lorsque la levure se développe sur un substrat respiratoire tel que le glycérol.

Comme montre la **figure 32**, les souches sauvages W303, WT-BY, WTBY restaurée, et les différents mutants sont plus sensibles à la PYO sur glycérol que sur YPD. Ces résultats peuvent être expliqués de plusieurs façons :

(i) l'hypothèse formulée par Baron et al. (1981 et 1989). L'activité antimicrobienne de la PYO résulte de son interaction directe avec la chaîne respiratoire inhibant ainsi les processus énergétiques. Nous étudierons davantage cette hypothèse en examinant l'effet de la PYO sur des mitochondries isolées.

(ii) le stress oxydatif. Une respiration mitochondriale active en présence de PYO conduirait à une production massive de ROS, qui pourrait dépasser la capacité de détoxification des ROS par *S. cerevisiae*.

Les souches hypersensibles à l' H_2O_2 sont, comme la majeure partie des souches, inhibées à 60-70 % par la PYO. Dans l'hypothèse d'un stress oxydatif, l' H_2O_2 ne serait donc pas nécessairement la ROS principalement impliquée.

Le mutant simple *sod1* qui ne peut pas exprimer la Cu-Zn superoxyde dismutase (localisée à 99 % dans le cytosol et à 1 % dans l'espace intermembranaire mitochondrial) est plus sensible à la PYO sur milieu YEPGly comparativement à WT-BY. La toxicité de la PYO serait donc liée en partie à la production d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Le mutant *zwf1*, affecté dans la production de NADPH, est moins sensible. La toxicité de la PYO serait donc aussi influencée par la disponibilité en NADPH.

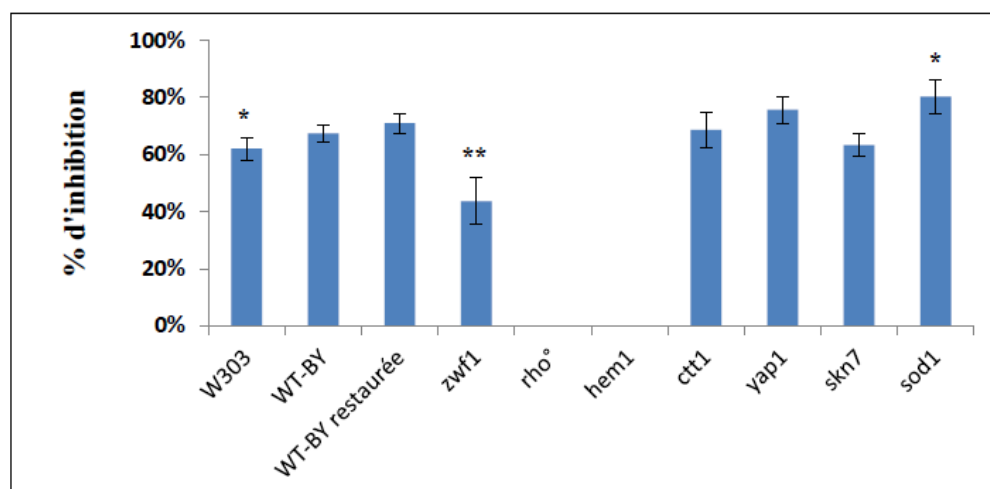


Figure 32: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, WT-BY restaurée et des mutants par la PYO 500 μM sur milieu YEPGly en aérobie (48 h de culture). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$.**

c. Sur milieu SM

Nous avons cultivé les différentes souches de *S. cerevisiae* sur milieu minimum (SM, glucose 10 g/l) durant 48 h en présence ou non de PYO (500 μM).

Nous n'avons pas observé de différence significative de sensibilité à la PYO des différentes souches testées entre milieu riche (**Figure 31**) et milieu minimum SM (**Figure 33**). Ces données suggèrent une nouvelle fois que la fermentation pourrait permettre aux levures de se protéger partiellement de la PYO. Les travaux de Baron et Rowe, (1981) l'ont montré dans le cas des bactéries.

Les souches hypersensibles à l' H_2O_2 sur SM (**Figure 28**) sont également peu inhibées par la PYO. Le stress oxydatif induit par la PYO est donc modéré sur SM.

De plus, nous avons constaté une acidification importante du milieu SM après 48 h de culture ; le pH diminue de 5,5 à environ 3,0. Une faible croissance cellulaire est obtenue ($DO_{600nm} \approx 1,6$). Nous avons donc considéré que la condition SM n'est pas appropriée pour étudier l'effet de la PYO.

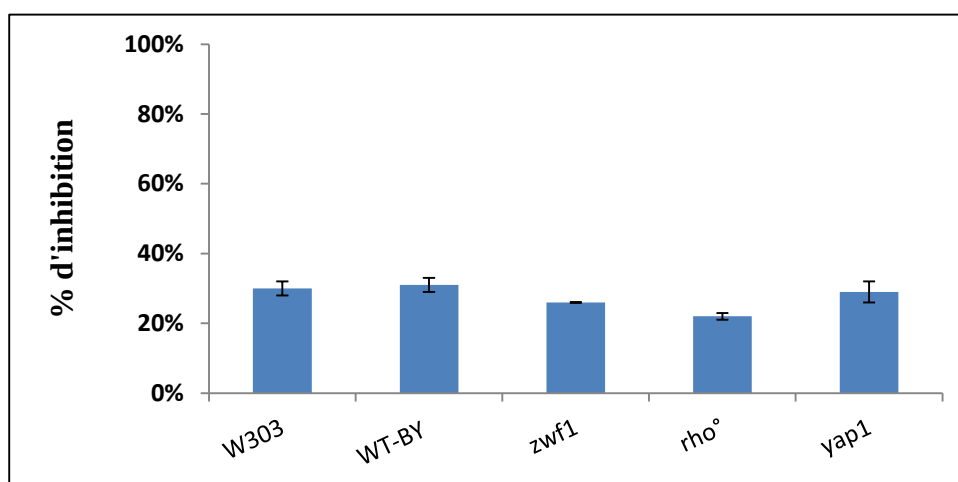


Figure 33: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY et des mutants par la PYO 500 μ M sur milieu SM en aérobie (48 h de culture).

d. Souches délétées dans les pompes d'efflux

Afin de déterminer si les pompes d'efflux sont impliquées dans la résistance de *S. cerevisiae* à la PYO nous avons comparé la sensibilité d'une souche de levure à celle d'un mutant dont les gènes codant pour plusieurs pompes d'efflux ont été délétés. Il s'agit du mutant AD123456789 (Rogers et al., 2001) délété pour 7 gènes (*YOR1*, *SNQ2*, *PDR5*, *YCF1*,

PDR10, *PDR11* et *PDR15*) codant pour des protéines de transport appartenant à la famille de transporteurs ABC et qui sont impliquées dans les processus de résistance multiple aux drogues. Ce mutant est également affecté dans les facteurs de transcription *PDR1* et *PDR3* impliqués dans la résistance multiple aux drogues chez la levure *S. cerevisiae* (Rogers et al., 2001). Nous avons également utilisé le mutant US50-18C portant la mutation activatrice *pdr1-3* qui induit la surexpression des transporteurs membranaires et confère une résistance multiple aux drogues (Rogers et al., 2001).

Les mutants AD1-9 et US50-18C ainsi que la souche parentale 2229-5C ont été cultivées sur milieu YPD durant 24 h et sur milieu YEPGly durant 48 h en présence ou non de PYO (500 μ M).

Sur milieu YPD, le mutant AD1-9 est plus sensible à la PYO que la souche sauvage 2229-5C et le mutant US50-18C (**Figure 34-A**), ce qui laisse supposer l'implication de pompes d'efflux dans la résistance à la PYO.

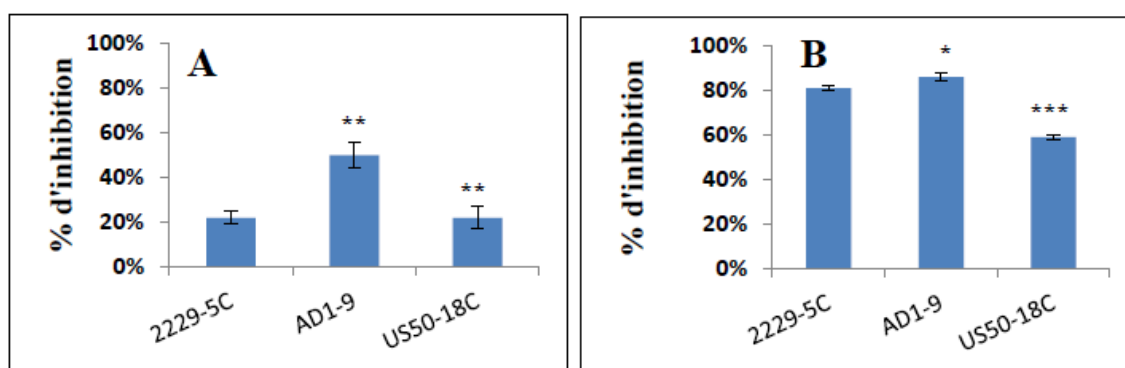


Figure 34: Pourcentage d'inhibition de la croissance de souche sauvage 2229-5C et des mutants AD1-9 et US50-18C, par la PYO 500 μ M en aérobie (A) sur milieu YPD (B) sur milieu YEPGly. *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001.**

Cependant, sur milieu YEPGly, la souche sauvage 2229-5C et le mutant AD1-9 sont hypersensibles à la PYO (80% et 86% d'inhibition respectivement) et le mutant US50-18C est modérément sensible (50% d'inhibition) (**Figure 34-B**).

Ces données suggèrent que les pompes d'efflux sont partiellement impliquées dans la résistance relative de *S. cerevisiae* à la PYO, notamment en conditions respiro-fermentaires (YPD). *S. cerevisiae* possède au total 16 gènes codant différents transporteurs ABC (Rogers et al., 2001) ; d'autres protéines de transport ABC pourraient être impliquées. De plus, un autre mécanisme pourrait expliquer la résistance relative de *S. cerevisiae* à la PYO, notamment l'imperméabilité de la paroi de *S. cerevisiae*.

e. Effets des antioxydants

Peu de données sont disponibles dans la bibliographie sur l'effet des antioxydants enzymatiques (catalase ...) et non enzymatiques (ascorbate, tiron...) vis-à-vis de la toxicité de PYO.

Dans ce contexte, nous avons testé l'effet de quatre antioxydants non enzymatiques (L-ascorbate, N-acétyl-l-cystéine, Tiron et Resvératrol) et l'effet d'un antioxydant enzymatique (catalase) sur la croissance de *S. cerevisiae* en présence ou non de PYO (500 μ M).

Les antioxydants non enzymatiques testés ont des mécanismes d'action différents :

Le l-ascorbate ou la vitamine C est un antioxydant hydrosoluble, elle est capable de réagir directement avec les ROS et en particulier $O_2^{\bullet-}$.

L'N-acétyl cystéine est un thiol dérivé de L-cystéine, c'est un précurseur de glutathion (GSH). Le glutathion (GSH) et les thiols en général, sont d'excellents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de puissants piègeurs de radicaux, réagissant directement avec le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde.

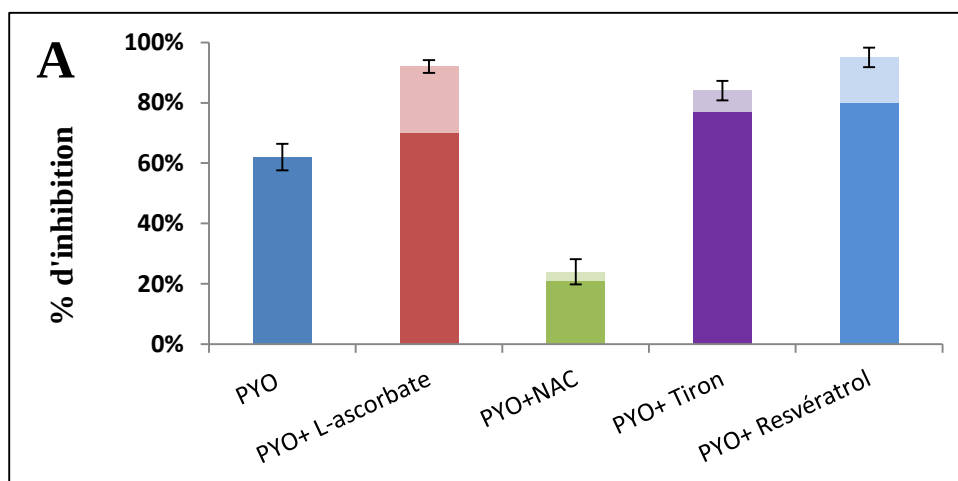
Le resvératrol est le représentant le plus connu des stilbènes (un groupe de polyphénols). L'activité antioxydante de resvératrol est très puissante, elle est due au caractère acide de la fonction phénol (donneur d'hydrogène) et à sa possibilité d'établir des liaisons hydrogènes. Cela lui confère la capacité de faire des réactions d'oxydoréduction.

Le Tiron est un antioxydant de petite taille. C'est un puissant piègeur de radicaux libres, il est capable de réagir directement avec les ROS et en particulier $O_2^{\bullet-}$.

i. Effets des antioxydants non enzymatiques

La toxicité de la PYO est accrue sur YEPGly. Dans cette condition, seul le NAC (N-acétyl-l-cystéine), précurseur du glutathion, protège de la toxicité de la PYO (**Figure 35 A et B**, souches W303 et WT-BY). Ce résultat est en accord avec les travaux de Gloyne et al. (2011) qui ont également observé que le NAC protège les cellules épithéliales de poumon des effets de la PYO.

Les antioxydants seuls (en absence de PYO) n'ont pas ou peu d'effet sur la croissance de *S. cerevisiae* (représentés par les parties claires des histogrammes, **Figures 35 A et B**).



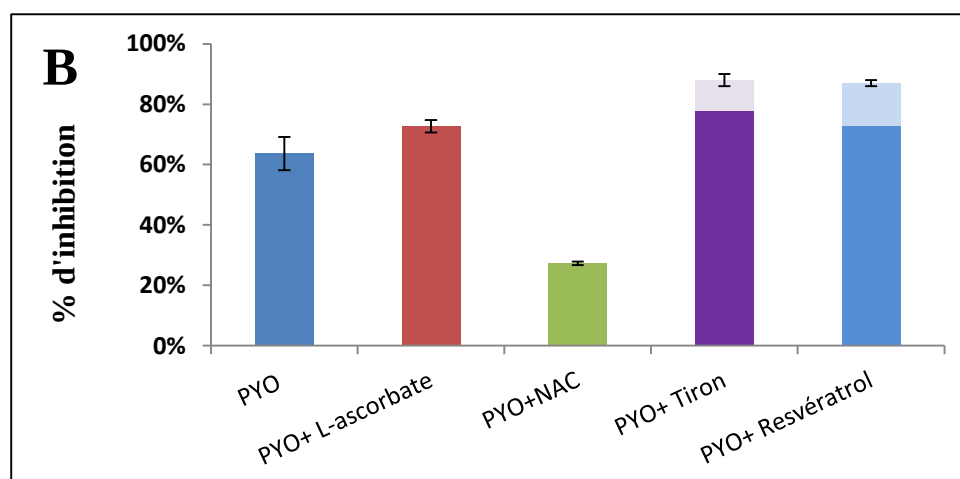


Figure 35: Effets de la PYO (500 μ M) en présence d'antioxydants (L-ascorbate 10 mM, NAC 5 mM, Tiron 1mM et Resvératrol 200 μ M) sur milieu YEPGly en aérobie, sur la croissance des souches (A) W303 (B) WT-BY. L'effet de la PYO en présence d'antioxydants est représenté par une barre d'histogrammes, l'effet des antioxydants seuls est superposé en couleur plus claire.

Le rôle antioxydant protecteur du NAC renforce l'hypothèse d'une toxicité de la PYO via un stress oxydatif.

ii. Effet de l'ajout de catalase

Parallèlement, nous avons testé l'effet d'un antioxydant enzymatique, la catalase, n'agissant qu'à l'extérieur des cellules. Comme attendu, la souche *yap1* n'est plus hypersensible à l' H_2O_2 en présence de la catalase en raison de l'élimination de l' H_2O_2 ajouté (**Figure 36**). En revanche, la catalase ne protège pas *S. cerevisiae* de la toxicité de PYO contrairement à ce qu'avaient observé Hassan et Fridovich (1980) avec *E. coli*, puis Muller (2002) avec des cellules épithéliales de poumon. Avec *S. cerevisiae* il semble donc que la toxicité de la PYO ne puisse pas être expliquée par un efflux de PYO réduite à l'extérieur de la cellule pour produire de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène comme l'ont a proposé Hassan et Fridovich (1980) puis Muller (2002).

Gardner (1996) a observé que la PYO peut inhiber les aconitases cytosolique et mitochondriale des cellules épithéliales de poumon par la production excessive d' $O_2^{\cdot -}$ à

l'intérieur de la cellule, O'Malley et al. (2003 a) suggèrent aussi que la production de ROS par la PYO serait intracellulaire. L'hypothèse d'une surproduction intracellulaire d'O₂⁻, et dans une moindre mesure d'H₂O₂, reste la plus probable chez *S. cerevisiae*.

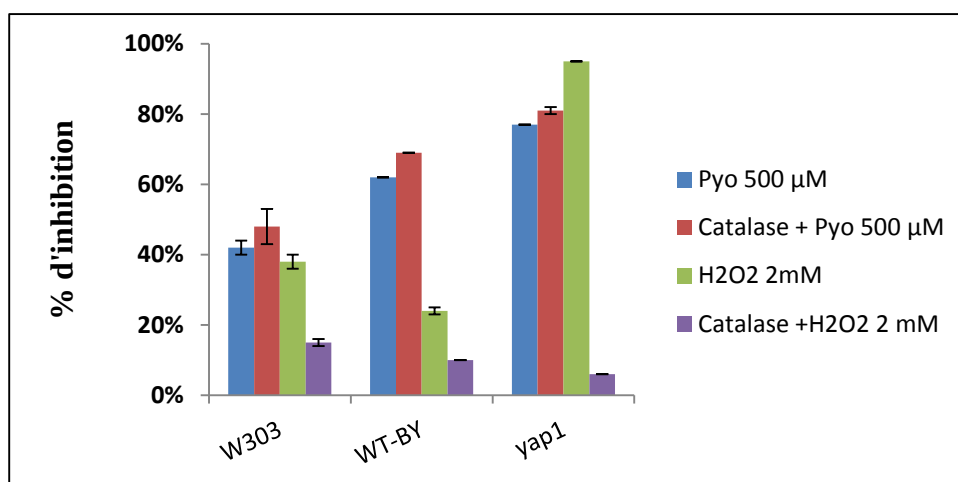


Figure 36: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY et *yap1* en présence respectivement de : PYO 500 µM, catalase 1000 unité/ml +PYO 500 µM, H₂O₂ 2mM et catalase+ H₂O₂ 2mM sur milieu YEPGly en aérobie (48 h de culture).

B. Sensibilité à la PYO en anaérobiose

La PYO est produite en hypoxie par *Pa*, et il a récemment été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la zone anaérobique du biofilm (Arai, 2011). De plus, certains auteurs pensent que dans le biofilm qui se développe dans les poumons des malades atteints de mucoviscidose, *Pa* est en anaérobiose lors de la formation de certains facteurs de virulence (Worlitzsch et al., 2002; Yoon et al., 2002). Enfin, il est admis que les conditions physiologiques rencontrées le plus souvent par les cellules microbiennes et eucaryotes sont des conditions de limitation en O₂.

Cependant, très peu d'études ont examiné l'effet de la PYO en condition anaérobiose ou hypoxie et aucune n'a concerné des cellules eucaryotes.

Nous avons donc étudié la toxicité de la PYO vis-à-vis de *S. cerevisiae* en anaérobiose. Dans un premier temps, nous avons cultivé les différentes souches en microplaques, sur milieu YPD+FA en présence de concentrations croissantes de PYO (100, 250 et 500 μ M), pendant 48 h en jarres d'anaérobioses.

De façon surprenante, nous avons constaté que la PYO a un effet inhibiteur sur la croissance de *S. cerevisiae* plus prononcé en anaérobiose sur YPD+FA (**Figure 37**) qu'en aérobie sur YPD ou sur YPD+FA (contrôle), quelle que soit la concentration de PYO utilisée et quelle que soit la souche testée.

Il existe cependant un biais potentiel lors de la réalisation de ces expériences. En effet dans les jarres, l'anaérobiose est obtenue grâce à l'utilisation de sachets générateurs d'anaérobiose. Or ils ne permettent pas d'éliminer instantanément toute trace d'O₂. L'anaérobiose est indiquée par virage de l'indicateur (Oxoid) du rouge au blanc après 4 heures environ.

La présence simultanée de traces d'O₂ et de la PYO lors des premières heures d'incubation, pourrait induire la production d'espèces réactives de l'O₂ (ROS) avec des effets d'autant plus délétères que les enzymes de détoxification sont plus faiblement exprimées chez *S. cerevisiae* en hypoxie (Ohmori et al., 1999; Clarkson et al., 1991). Cette hypothèse reste toutefois peu probable. La **figure 37** montre que le mutant *yap1*, hyper-sensible au stress oxydatif en anaérobiose (**Figure 29**), n'est pas plus sensible à la PYO que les autres souches.

Ces données suggèrent que le stress oxydatif n'est le mécanisme responsable de la toxicité de PYO envers *S. cerevisiae* en anaérobiose.

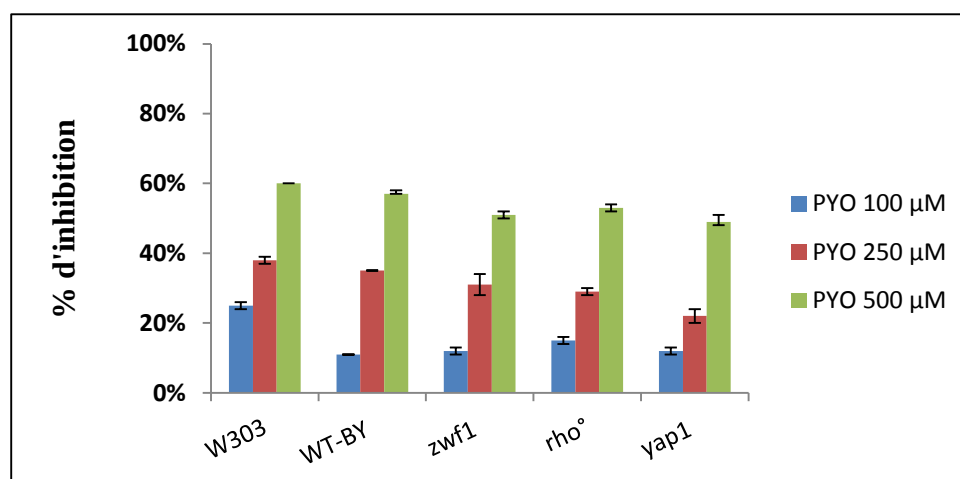


Figure 37: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, et des mutants par la PYO 100, 250 et 500 µM sur milieu YPD+FA en anaérobiose (jarres d'anaérobioses).

Pour dissiper le doute d'un stress oxydatif lors des premières heures de culture nous avons dans un deuxième temps, utilisé des tubes Hungate pour générer l'anaérobiose comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 2.d.vi). Nous avons vérifié de plusieurs façons qu'une anaérobiose relativement poussée pouvait être obtenue et maintenue dans les tubes Hungate : (i) le mutant *erg1* (mutant incapable de synthétiser des stérols et ne se développant qu'en anaérobiose en présence d'ergostérol et d'acides gras insaturés) nous a servi de témoin; nous avons vérifié que ce mutant peut se développer rapidement dans nos conditions d'anaérobioses (tubes Hungate) (ii) nous avons vérifié que les souches ne pouvaient pas du tout se développer avec du glycérol (substrat respiratoire) comme seule source de carbone.

Les résultats confirment ceux obtenus précédemment avec les jarres d'anaérobioses. Nous remarquons cependant que la PYO exerce un effet inhibiteur plus prononcé en anaérobiose obtenue par la technique Hungate (**Figure 38**) qu'en jarres d'anaérobioses. Ces résultats renforcent les conclusions précédentes : la toxicité de la PYO semble plus importante en anaérobiose qu'en aérobie et elle semble d'autant plus importante que l'anaérobiose est importante ou obtenue rapidement.

A notre connaissance, cet effet toxique de la PYO en condition de limitation en O₂ (condition physiologique reflétant l'environnement des cellules de poumon de malades) n'a jamais été mis en évidence.

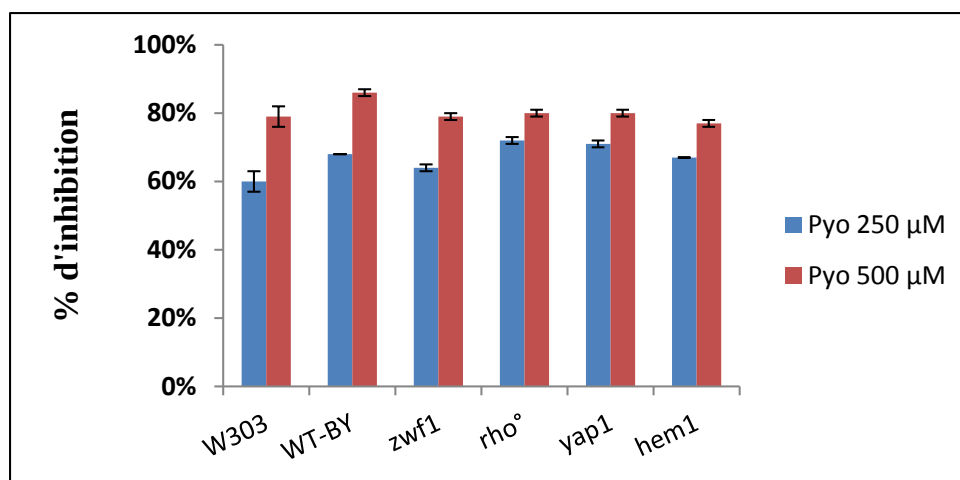


Figure 38: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303, WT-BY, et des mutants par la PYO : 250 et 500 μM sur milieu YPD+FA en anaérobie (Tubes Hungate).

De plus, la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae* en anaérobie (**Figure 39**) est observée pour des concentrations en PYO bien plus faibles (100 et 250 μM) qu'en aérobie (**Figure 30**).

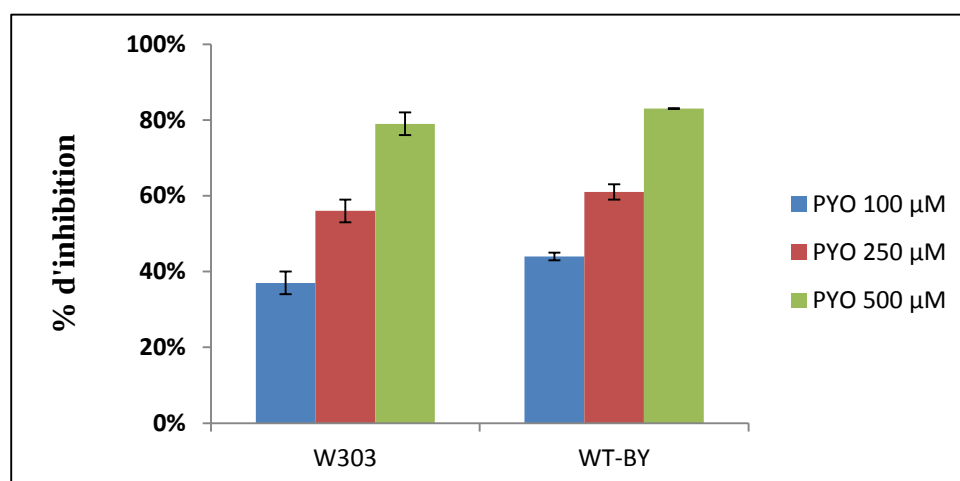


Figure 39: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303 et WT-BY par la PYO 100, 250 et 500 μM sur milieu YPD+FA en anaérobie (Tubes Hungate).

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la toxicité anaérobie de la PYO:

(i) une déplétion drastique en agents réducteurs NAD(P)H affecterait la croissance. En effet, l'une des caractéristiques de la PYO est sa possible réduction non-enzymatique par le NAD(P)H. Or, en anaérobiose *S. cerevisiae* est auxotrophe pour l'acide nicotinique (Panozzo et al., 2002) nécessaire pour la synthèse de NAD(P)H. Cette hypothèse semble peu probable puisque la souche *zwf1* (souche affectée dans la production du NADPH) présente la même sensibilité à la PYO en anaérobiose que la souche parentale et les autres mutants. De plus, nous avons vérifié que l'ajout d'acide nicotinique (2 mg/l) chez la souche WT-BY ne modifie pas la sensibilité de cette souche à la PYO en anaérobiose.

(ii) la formation de PYO radical (PYOH[•]) selon le mécanisme suivant :



En absence d'O₂, il y aurait davantage de PYOH[•] (PYO radical) dans la cellule. La présence de PYO radical a été mise en évidence par EPR en anaérobiose chez *E. coli* par Hassett et al. (1992) et *in vitro* par Britigan et al. (1992), ainsi que Reszka et al. (2004). Le PYO radical formé pourrait s'avérer plus toxique pour *S. cerevisiae* que les ROS. Le PYO radical pourrait réagir avec des composants cellulaires et les endommager, ou il pourrait inhiber voir inactiver une/des enzymes spécifiques.

De plus, le mutant déficient respiratoire *rho*^o est beaucoup plus sensible à la PYO en anaérobiose qu'en aérobie. Ces données renforcent l'hypothèse d'une toxicité accrue de la PYO en anaérobiose. De façon surprenante, la présence d'O₂ permettrait donc de minimiser la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae*.

Il est également envisageable que le PYO radical soit plus rapidement formé en anaérobiose qu'en aérobie, puisque le flux glycolytique et la production de NADH sont plus importants en anaérobiose (Beauvoit et al., 1993).

La PYO pourrait perturber le flux glycolytique et le métabolisme du glucose chez *S. cerevisiae*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cultivé les deux souches sauvages WT-BY et W303 en anaérobiose (tubes Hungate) pendant 24 h, 48 h et 72 h, et nous avons analysé les sous produits de fermentation.

Les résultats obtenus montrent que la PYO exerce un effet inhibiteur important sur la croissance anaérobie de WT-BY et W303 à 24, 48 et 72 heures (**Figure 40**).

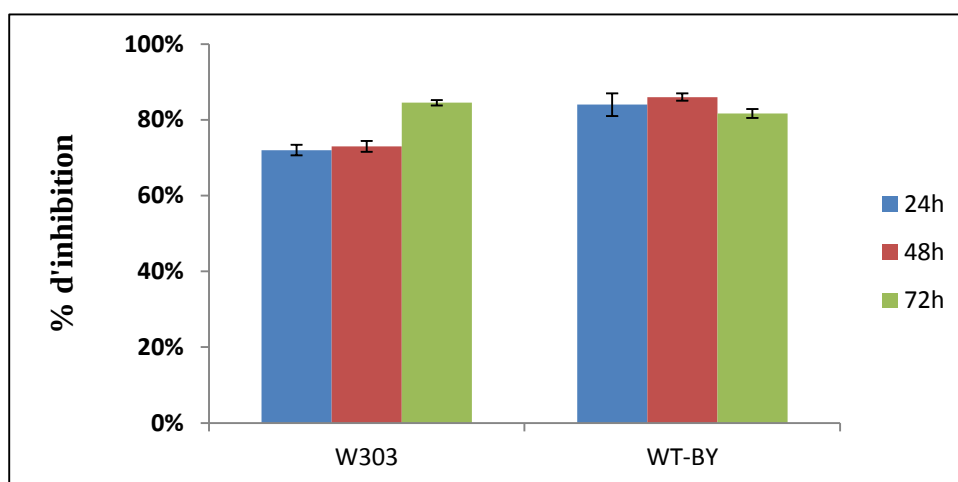


Figure 40: Pourcentage d'inhibition de la croissance des souches W303 et WT-BY par la PYO 500 μ M sur milieu YPD+FA en anaérobiose (Tubes Hungate) à 24 h, 48 h et 72 h de culture.

Cependant, nous n'avons pas détecté de modification significative au niveau du rendement final de conversion du glucose en glycérol, ou du glucose en éthanol en présence et en absence de la PYO (**Tableau 10**, Souches W303 et WT-BY). De plus, nous n'avons pas pu détecter l'accumulation d'autres produits de fermentation (pyruvate, succinate, malate) en présence de la PYO après 48 h de culture. Des résultats similaires ont été obtenus à 24 h et 72 h (**données non montrées**).

Ces résultats permettent de suggérer que la PYO ne perturbe pas les voies fermentaires chez *S. cerevisiae* en anaérobie.

Tableau 10: Effet de la PYO (500 μ M) sur les principaux paramètres de croissance anaérobie des souches W303 et WT-BY (48 h de culture, sur YPD+FA).

	WT-W303		WT-BY	
	- PYO	+PYO	-PYO	+PYO
DO_{600nm}	1.78	0.39	2.66	0.365
Glucose consommé	111	63.1	110	47.1
Éthanol produit	177	102	186	73
Rendement éthanol/glucose	0.80	0.82	0.85	0.76
Glycérol produit	11.9	7.9	9.4	5.6
Rendement glycérol/glucose	0.054	0.063	0.043	0,059

a. La Viabilité cellulaire

Nous avons étudié la viabilité des cellules anaérobies, en présence de la PYO par deux méthodes distinctes : la méthode de coloration par le bleu Trypan et la méthode d'étalement sur boîte de Pétri comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 3.b). La viabilité cellulaire n'est pas affectée par la PYO (**données non montrées**). La PYO ralentit la croissance anaérobie de *S. cerevisiae* mais ne la tue pas.

b. Recouvrement de la PYO

Afin de déterminer si la PYO a été transformée ou dégradée par la levure, nous avons analysé les spectres de la PYO après incubation en anaérobie et nous les avons comparés avec le spectre de PYO diluée dans du surnageant de culture.

Nous n'avons pu analyser que la zone spectrale 400-700 nm car le milieu riche absorbe fortement dans la zone 200-400 nm. Cependant dans cette zone (400-700 nm) les

spectres après 24 heures de culture ne présentent pas de différence significative (**données non montrées**). Aucune dégradation de la PYO n'a donc été détectée. La toxicité ne serait pas due à l'accumulation d'un sous-produit de dégradation de la PYO. Ce résultat n'est toutefois pas incompatible avec l'hypothèse d'une fraction de PYO radical réagissant avec des composants cellulaires en début de croissance.

c. Effets des antioxydants

Nous avons également testé l'effet d'antioxydants non enzymatiques (L-ascorbate, N-acétyl-L-cystéine, Tiron et Resvératrol) sur la croissance de *S. cerevisiae* en anaérobiose.

Aucun antioxydant y compris le NAC ne protège de la toxicité de PYO vis-à-vis de *S. cerevisiae* en anaérobiose (**Figure 41**, souches W303 et WT-BY). Ces résultats confirment que les traces d'O₂ et le stress oxydatif n'expliquent pas la toxicité de PYO envers *S. cerevisiae* en anaérobiose.

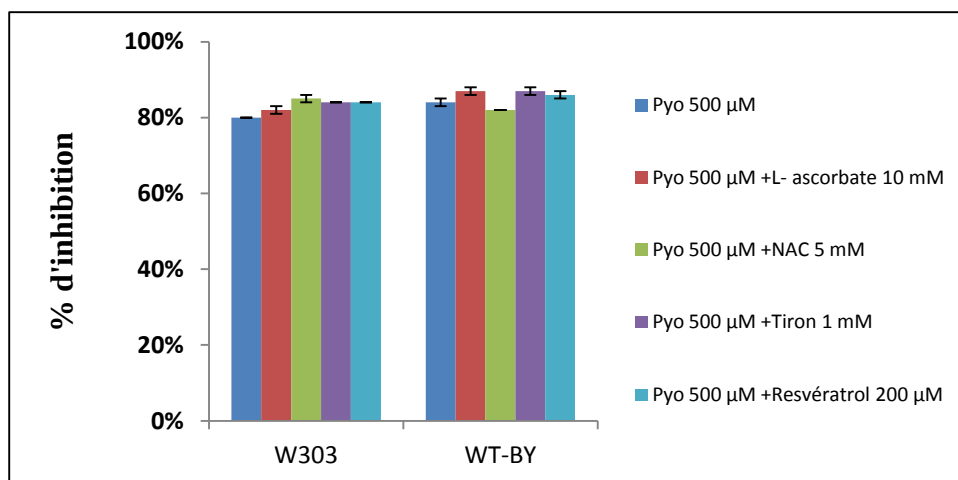


Figure 41: Effets de la PYO (500 µM) et des antioxydants (L-ascorbate 10 mM, NAC 5 mM, Tiron 1 mM et Resvératrol 200 µM) sur la croissance de souches W303 et WT-BY sur milieu YPD+FA en anaérobiose (24 h de culture).

3. Effet de la PYO sur la respiration de *S. cerevisiae*

A. Mesure de la consommation d'O₂ en absence et en présence de PYO ("JO₂ spécifique").

Nous avons constaté précédemment que la respiration pourrait accroître la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae*, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence s'il existe une interaction directe entre la PYO et la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*. De plus, il n'existe aucune donnée concernant les effets directs de la PYO sur la respiration de *S. cerevisiae*. Nous avons donc étudié cette question.

a. Respiration des cellules en culture

Dans un premier temps, la capacité des cellules à consommer de l'O₂ en présence de PYO (100 µM) et/ou en présence de KCN (0,3 mM) a été évaluée en mesurant les JO₂ spécifiques des cellules en culture (oxygraphe classique). Les cellules ont été récoltées en phase de croissance et resuspendues dans leur surnageant de culture.

Comme attendu, nous avons constaté que la souche sauvage WT-BY (dénuée d'Hap1p fonctionnel) a une moindre capacité à respirer que la souche WT-W303. De plus, la PYO (100 µM) n'a pas d'effet significatif sur la respiration de *S. cerevisiae* sur milieu YPD. L'ajout de KCN (0,3 mM) après l'ajout de PYO bloque la respiration des deux souches WT-BY et W303 (**Figure 42-A**).

L'ajout de PYO en présence de KCN n'a pas d'effet significatif (**Figure 42-B**). Ces résultats s'opposent aux travaux de Baron et Rowe (1989) et aux travaux de Hassan et Fridovich (1980) qui ont montrée que l'ajout de PYO (100 µM) après KCN (1 mM), permet une reprise de la consommation de l'O₂ chez *E. coli*. Ces résultats peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- (i) l'imperméabilité de la paroi de levure à la PYO
- (ii) l'absence d'interaction entre la PYO et la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*.

(iii) une interaction avec la chaîne respiratoire ne se traduisant par aucun effet visible immédiat sur les flux d'O₂.

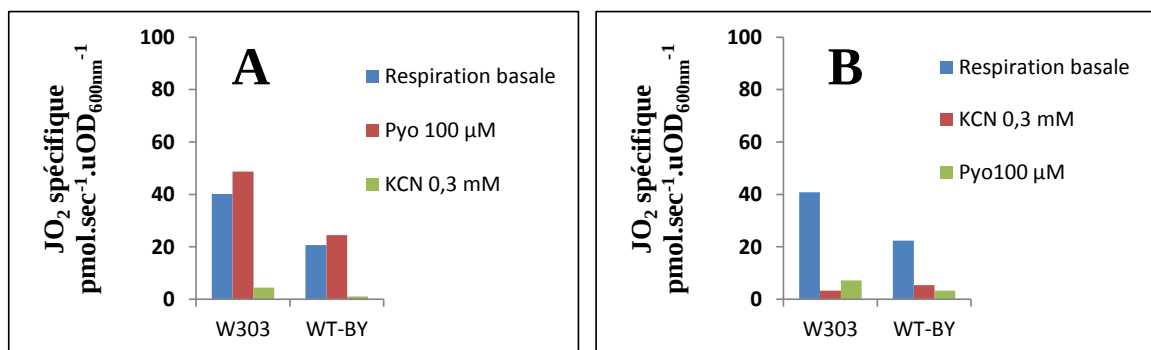


Figure 42: JO₂ spécifique des cellules de W303 et WT-BY (issues d'une culture sur YPD) et resuspendues dans leur propre surnageant : respiration basale et après l'ajout successif de (A) PYO 100 μM puis KCN 0,3 mM (B) KCN 0,3 mM puis PYO 100 μM. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

b. Respiration des cellules lavées

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les JO₂ des cellules lavées avec ou sans l'ajout d'un substrat exogène (oxygraphe haute résolution).

Les résultats obtenus, ont montré qu'en absence (respiration endogène) ou en présence de glucose (**Figure 43-A**), l'ajout de PYO (100 μM) n'a pas d'effet. L'ajout de KCN inhibe totalement la respiration. L'ajout de PYO en présence de KCN est aussi sans effet (**Figure 43-B**).

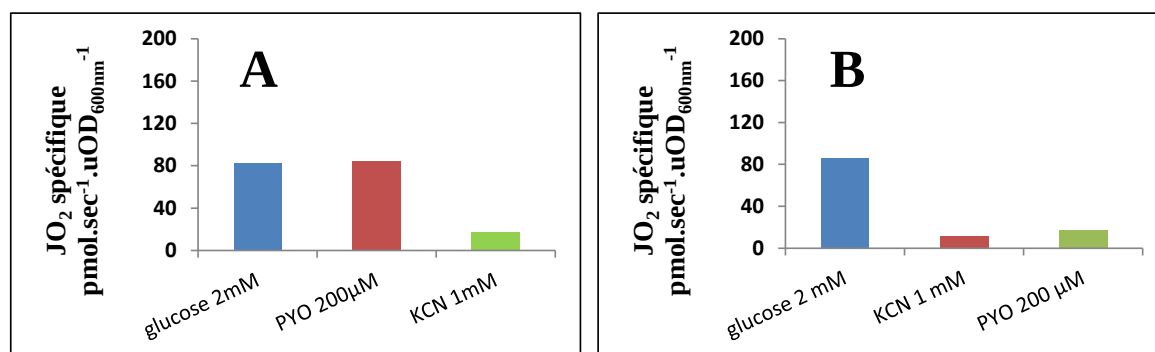


Figure 43: JO₂ spécifique de cellules lavées de W303 (issues d'une culture sur YPD) après l'ajout successif de (A) glucose (2 mM), PYO (100 μM) puis KCN (1 mM) (B) glucose (2 mM), KCN (1 mM) puis PYO (100 μM). (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

Des résultats similaires ont été obtenus pour des cellules cultivées sur YEPGly. La PYO n'a pas d'effet sur les JO₂ endogènes quelle que soit la concentration ajoutée (100-400 μM) (**Figure 44**). L'ajout consécutif de PYO après le KCN est aussi sans effet (**Figure 45**).

Ces résultats s'opposent en apparence aux profils d'inhibition de croissance. En effet, les données discutées précédemment (§2.A.b) suggéraient que la toxicité de la PYO était renforcée dans les cellules à respiration active. La PYO pourrait diffuser lentement à l'intérieur des cellules et exercer des effets « discrets » sur la respiration mitochondriale. Nous avons donc, dans un second temps, étudié l'effet de PYO sur des mitochondries isolées.

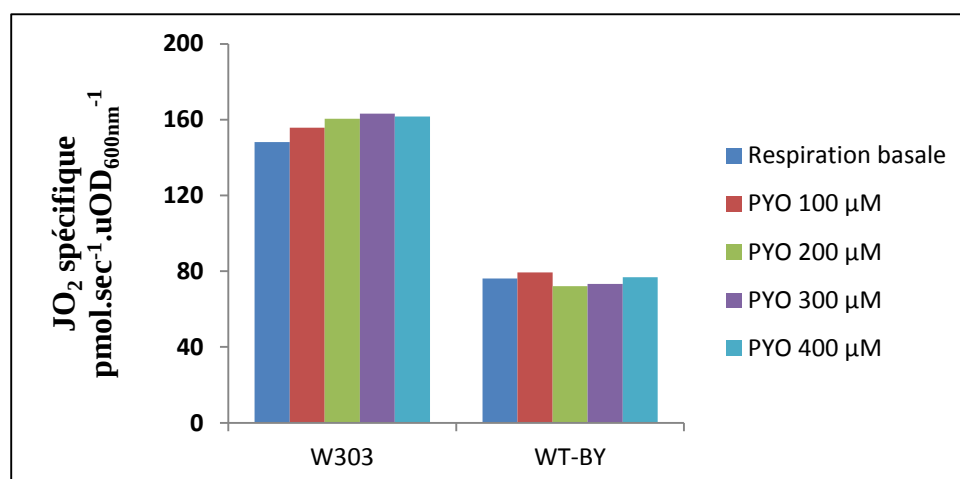


Figure 44: JO_2 spécifique des cellules lavées de W303 et WT-BY (issues d'une culture sur YEPGly), respiration basale et après l'ajout successif de PYO 100, 200, 300 et 400 μM.

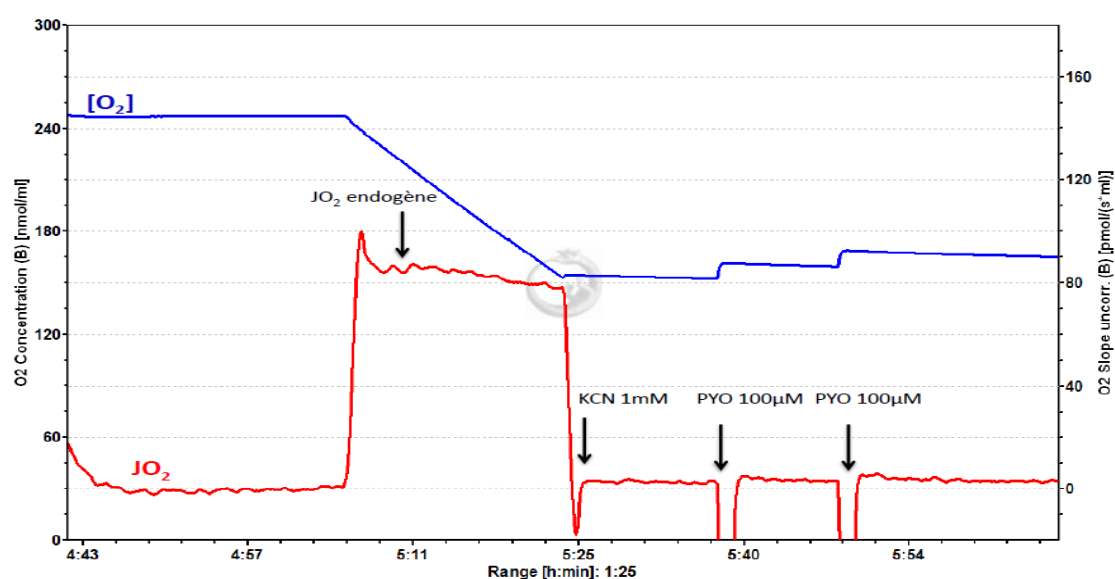


Figure 45: Suivi de JO_2 endogène des cellules lavées de W303 (issues d'une culture sur YEPGly) après l'ajout successif de KCN (1 mM) puis de PYO 200 μM. La concentration en O₂ est en bleue et la vitesse de consommation d'O₂ est en rouge.

c. Respiration mitochondriale

Les cultures aérobies sur lactate (20 g/l) permettent d'obtenir de très bons rendements de purification de mitochondries. Avant d'étudier la respiration mitochondriale, nous avons déterminé l'effet de la PYO sur les JO_2 endogènes des cellules WT-W303 cultivées sur lactate.

Comme déjà observé pour les autres conditions de culture, la PYO (100 μM) n'a pas d'effet (à court terme) sur les JO_2 endogènes des cellules cultivées sur lactate (**Figure 46**). L'ajout de PYO (100 μM) après KCN est également sans effet sur la vitesse de consommation d' O_2 par *S. cerevisiae* cultivée sur lactate (**données non montrées**).

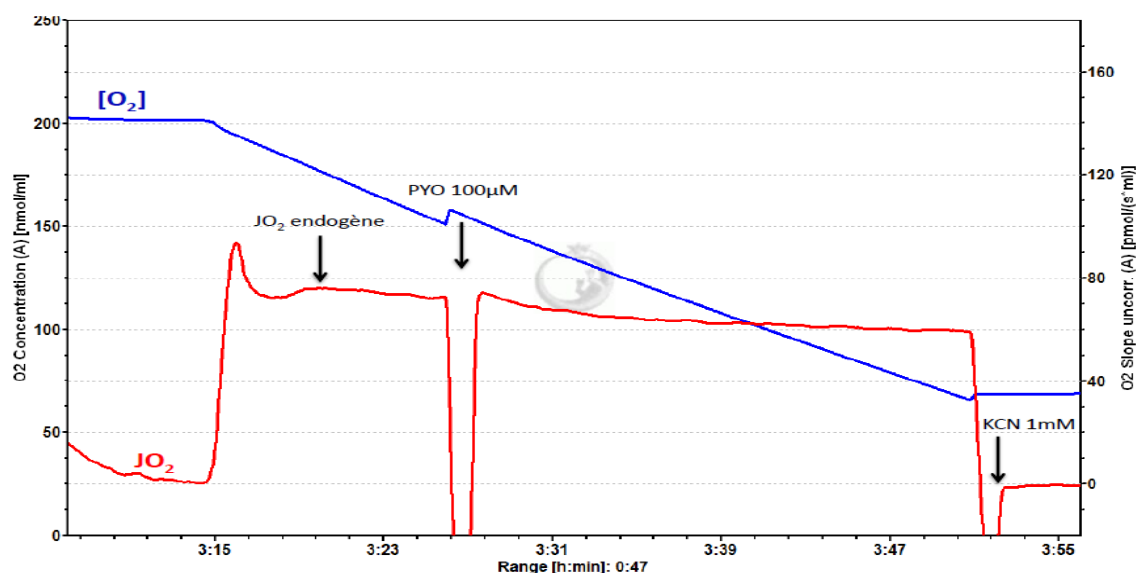


Figure 46: Suivi de JO_2 endogène des cellules lavées de W303 (issues d'une culture sur D-L lactate) après l'ajout successif de PYO (100 μM) puis de KCN (1 mM). La concentration en O_2 est en bleue et la vitesse de consommation d' O_2 est en rouge.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré l'effet de la PYO sur la respiration de mitochondries isolées. Les mitochondries de la souche WT-W303 ont été préparées par M. Stephen Manon (CNRS Bordeaux). Comme attendu, pour des mitochondries intègres et fonctionnelles, la respiration sur succinate 10 mM est fortement stimulée en présence d'ADP (0,5 mM). C'est l'état 3 de respiration. Dans ces conditions, l'ajout de PYO (100 μM) n'a pas

ou peu d'effet sur la respiration mitochondriale (**Figure 47 A et B**). En présence de PYO, le KCN (1 mM) inhibe fortement mais pas totalement la respiration (**Figure 47-A**). Cependant, l'ajout de HQNO après la PYO inhibe presque totalement la respiration (**Figure 47-B**).

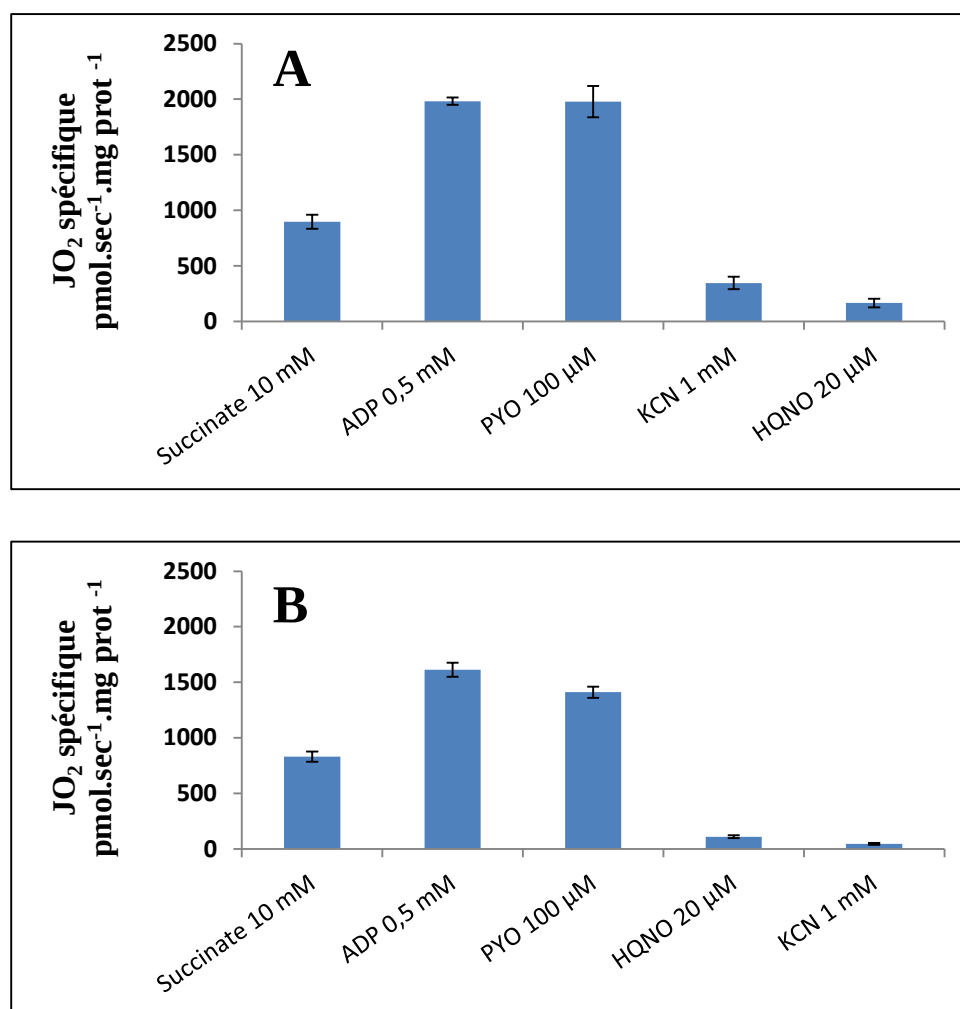


Figure 47: JO₂ spécifiques des mitochondries isolées de W303 (issues d'une culture sur lactate), après ajouts successifs de (A) succinate (10 mM), ADP (0,5 mM), PYO (100 µM) KCN (1 mM) et HQNO (20 µM) (B) le HQNO a été ajouté avant le KCN.

En revanche, en conservant les mêmes conditions expérimentales (respiration stimulée par l'ADP), l'ajout de PYO après le KCN permet une reprise de la consommation de l'O₂ (**Figure 48-A**). De plus, la consommation de l'O₂ stimulée par la PYO est partiellement sensible à l'ajout de HQNO (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire). En

présence d'HQNO, l'ajout de PYO ne permet aucune reprise de la consommation d'O₂ (**Figure 48-B**). Des résultats similaires ont été obtenus avec le myxothiazol et l'antimycine A (inhibiteurs spécifiques du complexe III de la chaîne respiratoire) et également à l'état 4 (absence d'ADP, excès d'ATP matriciel) (**données non montrées**).

Ces données mettent en évidence une interaction de la PYO au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*. La PYO pourrait donc provoquer un stress oxydatif suite à son interaction avec la chaîne respiratoire mitochondriale, elle pourrait également affecter les processus énergétiques (la production d'ATP). Les dosages d'ATP n'ont malheureusement pas pu être réalisés à ce jour.

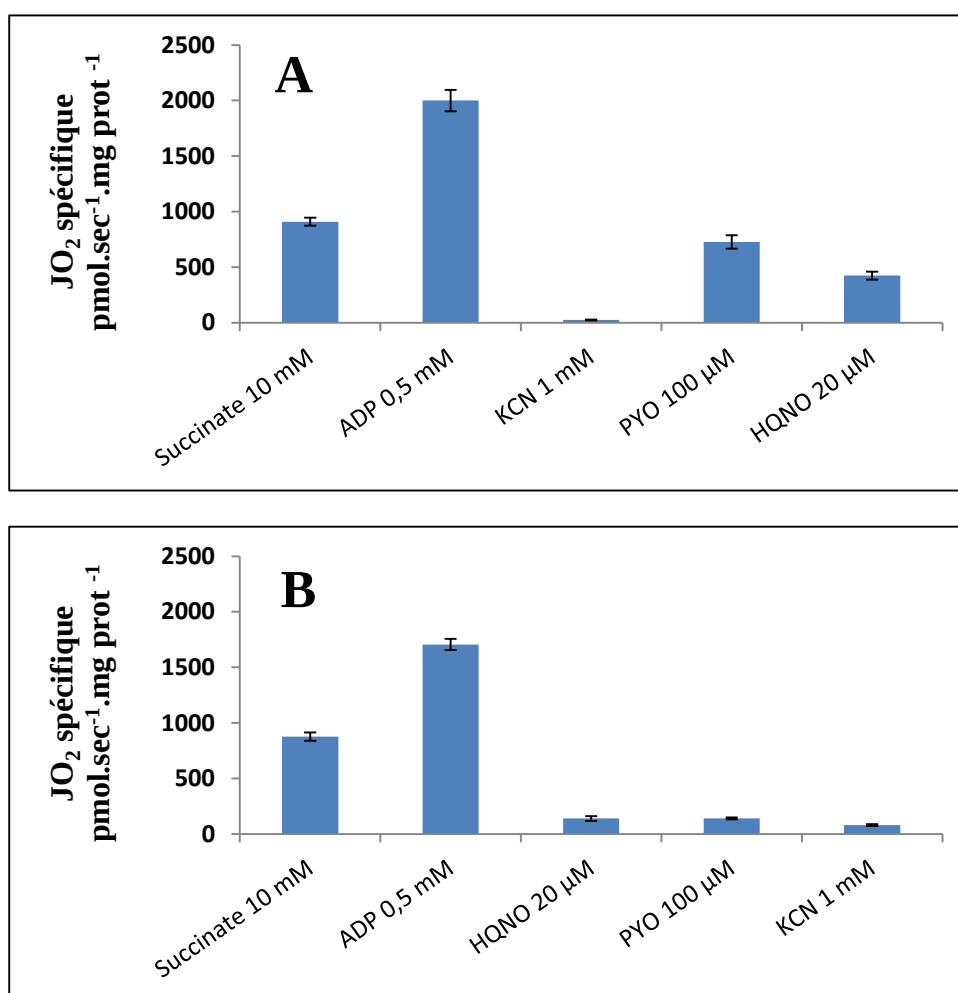


Figure 48: JO₂ spécifique des mitochondries isolées de W303 (issues d'une culture sur lactate) après ajouts successifs de succinate (10 mM), ADP (0,5 mM) (A) KCN (1 mM), PYO (100 µM) et HQNO (20 µM) (B) HQNO (20 µM), PYO (100 µM) et KCN (1mM).

4. Conclusion sur la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae*

Au cours de cette étude, nous avons pu constater une résistance partielle de la levure *S. cerevisiae* à la PYO. Comme observé chez *C. albicans* (Kerr et al., 1999), une concentration relativement élevée en PYO (500 μM) est nécessaire pour inhiber la croissance de *S. cerevisiae*. Cette résistance est en partie expliquée par les pompes d'efflux de type ABC. Elle pourrait faire intervenir aussi d'autres caractéristiques des levures telles des propriétés de la paroi limitant la pénétration de la PYO à l'intérieur de la cellule.

En examinant les effets de la PYO sur la croissance, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre la toxicité de la PYO et la compétence respiratoire. En aérobie nos résultats suggèrent que la toxicité de la PYO est multifactorielle, une partie étant très probablement due à l'interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire, diminuant la capacité de la cellule à fournir de l'énergie mais générant peut être aussi un stress oxydatif. Le stress oxydatif impliquant en particulier l'anion superoxyde (O_2^-), ferait suite à la réduction non-enzymatique de la PYO par le NADPH. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la contribution du NADH dans ces phénomènes.

Une partie de ce travail a aussi porté sur la caractérisation de l'effet direct de la PYO sur les flux spécifiques de consommation d' O_2 chez *S. cerevisiae*. La PYO n'a pas d'effet détectable à court terme sur la respiration cellulaire. Grâce aux expérimentations effectuées sur les mitochondries isolées, nous avons pu mettre en évidence une interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* niveau du complexe III.

Un point majeur de notre étude a consisté à caractériser les effets de la PYO en conditions de limitation ou d'absence d' O_2 . Nous avons pu montrer sans ambiguïté que la PYO exerce une toxicité plus importante en anaérobiose chez la levure *S. cerevisiae*. Cette toxicité anaérobie de la PYO n'a jamais été mise en évidence. Elle serait due à la formation du PYO radical probablement fortement toxique pour des cellules non préparées à une exposition radicalaire.

Chapitre 2 :

Étude de l'activité antibactérienne de la pyocyanine.

1. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées lors de cette étude

Plusieurs études ont examiné l'activité antibactérienne de la PYO (Schoental, 1941; Waksman et Woodruff., 1942; Hassan et Fridovich, 1980; Baron et Rowe, 1981; Baron et al., 1989; Hassett et al., 1992; Voggu et al., 2006) et différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer cette activité. Seule deux études ont porté sur un nombre important de bactéries (Baron et Rowe, 1981; Baron et al., 1989). Les connaissances concernant l'activité antibactérienne de la PYO reste donc encore lacunaires, et à plus forte raison celles sur les mécanismes d'action.

Dans ce contexte nous avons réexaminé l'activité antibactérienne de la PYO en testant tout d'abord, l'effet de la PYO sur la croissance d'un panel important de bactéries Gram + /-, oxydase + /-, et possédant différentes voies de dégradation du glucose (voie d'Emdden-Meyerhof-Parnas, voie des pentoses phosphates et/ou voie d'Entner-Doudoroff).

Nous avons également inclus différentes espèces du genre *Pseudomonas* : *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*, et la souche productrice *P. aeruginosa* (souche PA14) ; deux souches de PA14 ont été examinées, une souche de référence PA14 WT et la souche PA14 Δ phz1-2 affectée dans la production de phénazines dont la PYO. Les caractéristiques de l'ensemble des souches Gram + et Gram - utilisées dans cette étude sont répertoriées respectivement dans **les tableaux 11 et 12**.

Tableau 11 : Caractéristiques des bactéries Gram + utilisées lors de cette étude.

SOUCHE	Oxydase +/-	Respiration sur Nitrate	Ferm	Voie EM	Voie ED	Voie PP
<i>Bacillus subtilis</i>	+	oui	non	non	non	O/N
<i>Bacillus megaterium</i>	+	oui	non	oui	non	O/N
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	non	oui	oui	oui	O
<i>Micrococcus luteus</i> *	+	non	non	non	non	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	oui	oui	oui	non	N
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	oui	oui	oui	non	N

Tableau 12: caractéristiques des bactéries Gram - utilisées lors de cette étude.

SOUCHE	Oxydase +/-	Respiration sur Nitrate	Ferm	Voie EM	Voie ED	Voie PP
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	oui	oui	oui	oui	O/N
<i>Escherichia coli</i>	-	oui	oui	oui	oui	O/N
<i>Proteus vulgaris</i>	-	oui	oui	non	oui	O/N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	oui	non	non	oui	N
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	oui	non	non	oui	N
<i>Pseudomonas putida</i>	+	non	non	non	oui	O/N
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	non	non	non	oui	O/N
<i>Xanthomonas campestris</i>	+	oui	oui	non	oui	O/N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	oui	oui	oui	oui	O/N
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	oui	oui	oui	oui	O/N
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	+	oui	oui	non	oui	O/N
<i>Vibrio anguillarum</i>	+	oui	oui	non	oui	O/N
<i>Vibrio splendidus</i>	+	oui	oui	non	oui	O/N
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	+	non	non	non	oui	O/N
<i>Serratia marcescens</i>	-	oui	oui	oui	oui	O/N

Ferm : Fermentation du glucose

Voie EM : Voie d'Emden-Meyerhof (glycolyse)

Voie ED : Voie d'Entner-Doudoroff

Voie PP : Voie des pentoses phosphates ; O = étape oxydative ; N = étape non-oxydative

* La souche *Micrococcus luteus* est équipée de toutes les enzymes de la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse), exceptée la glucokinase (Young et al., 2010), elle ne peut donc pas se développer sur glucose comme seule source de carbone.

2. Effet de la PYO sur la croissance bactérienne

A. Sensibilité à la PYO en aérobie

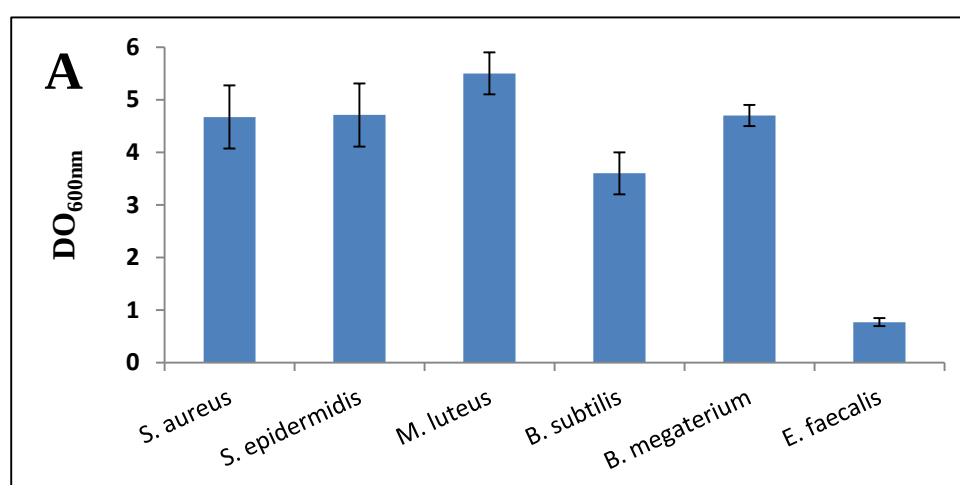
La sensibilité des différentes souches bactériennes à la PYO (100 μ M) a été évaluée à l'aide de tests en cultures liquides aérobie sur microplaques, comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 2.d.ii).

a. Sur milieu riche

L'effet de la PYO sur la croissance des bactéries a tout d'abord été étudié sur milieux riches : MB pour les *vibrio*, LB pour PA14 et BHI pour les autres souches.

Toutes les bactéries Gram + testées présentent une bonne croissance ($DO_{600nm} \geq 4$) à l'exception d'*E. faecalis* ($DO_{600nm} < 1$) (**Figure 49-A**).

La **figure 49-B** montre que les bactéries Gram + sont hypersensibles à la PYO (100 μ M) hormis *E. faecalis* qui est totalement résistante.



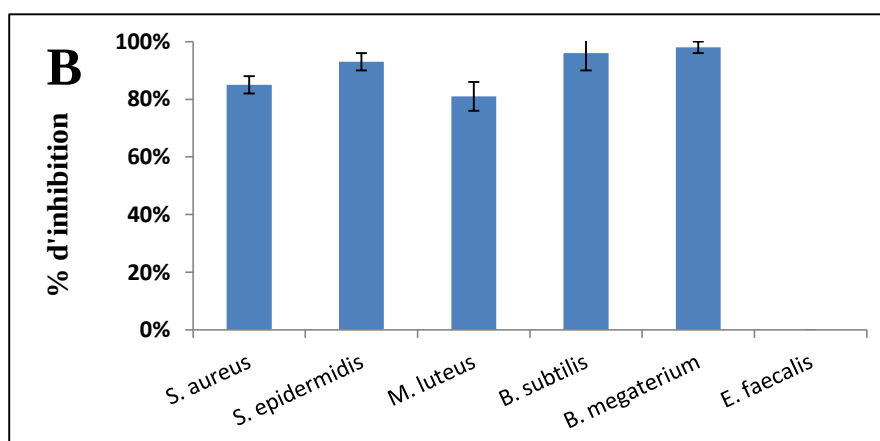


Figure 49: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram + après 24 h d'incubation sur milieu riche (BHI) à 30°C en aérobie.

Les résultats obtenus pour *S. aureus* et *S. epidermidis* sont en accord avec les travaux de Baron et al. (1989), Kumar et al. (1997) et Voggu et al. (2006). Ces auteurs avaient déjà mis en évidence l'hypersensibilité des *staphylocoques* à la PYO. De même, nous retrouvons des résultats similaires à ceux publiés par Baron et Rowe (1981) et Baron et al. (1989) pour *M. luteus* et *B. megaterium*.

En revanche, les résultats obtenus avec *B. subtilis* s'opposent à ceux de Baron et Rowe (1981), nous observons une forte inhibition de *B. subtilis* en présence de PYO, alors que Baron et Rowe (1981) n'avaient observé qu'un effet modéré de la PYO.

La résistance d'*E. faecalis* à la PYO peut être expliquée par le fait qu'*E. faecalis* est une souche incapable de respirer si de l'hème n'est pas ajouté au milieu, ce qui était le cas dans nos expériences. La bactérie a donc fermenté et s'est faiblement développée sur glucose (**Figure 49-A**). Baron et Rowe (1981) ont suggéré que la fermentation est l'un des mécanismes qui permet aux bactéries de résister à la PYO. Il est probable que la résistance observée soit due à ce mécanisme.

Les bactéries Gram – présentent également une bonne croissance dans nos conditions (DO_{600nm} compris entre 2 et 4), hormis les *Vibrios* qui présentent une faible croissance sur milieu MB à 30°C ($DO_{600nm} \geq 0,7$) (**Figure 50-A**).

La **figure 50-B** montre cependant que la croissance de certaines bactéries Gram - est fortement affectée par la PYO (plus de 80 % d'inhibition). C'est le cas de la souche *S. typhimurium* cultivée sur BHI et des souches de *Vibrio* (*V. nigripulchritudo*, *V. splendidus* et *V. anguillarum*).

En revanche, d'autres bactéries Gram - telles qu'*E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae* et *P. vulgaris* sont moyennement sensibles (de 45 à 60 % d'inhibition). *K. pneumoniae*, est peu affectée par la PYO (≈ 25 % d'inhibition).

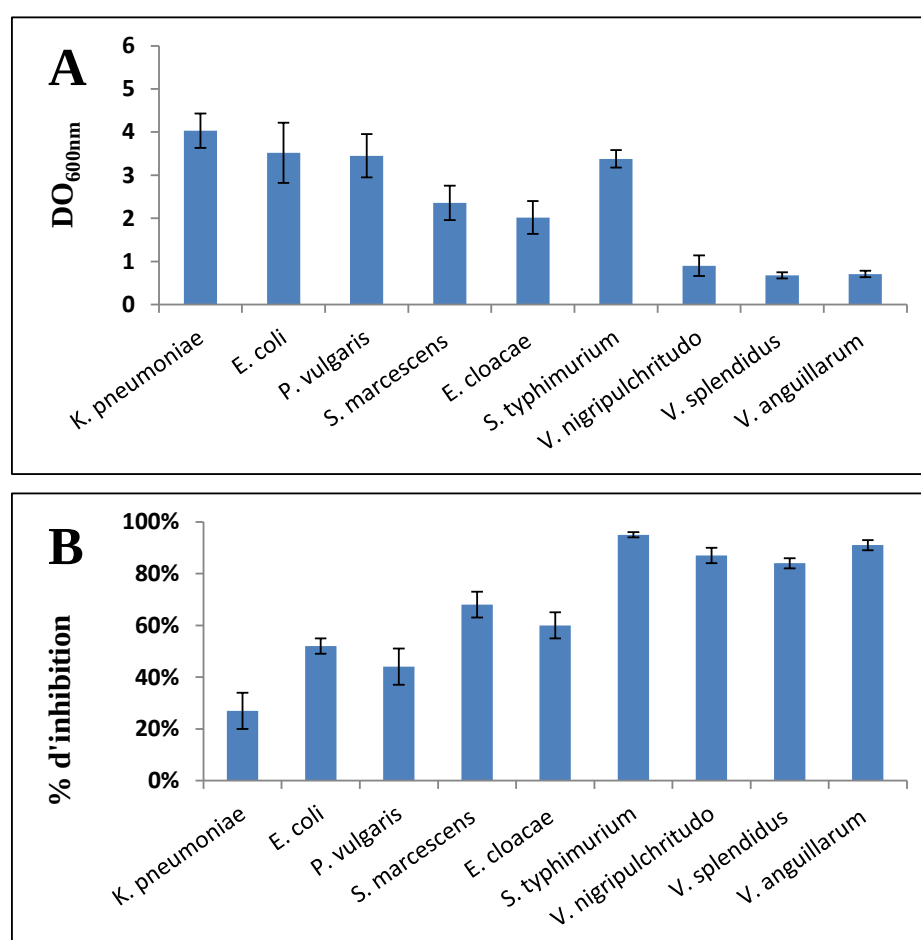


Figure 50: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram – sur milieu riche (BHI ou MB), après 24 h d'incubation à 30°C en aérobie.

Les résultats obtenus pour *E. coli*, *S. marcescens* et *K. pneumoniae* sont en accord avec les travaux de Baron et Rowe (1981) et ceux de Baron et al. (1989) qui ont montré qu'*E. coli*, et *S. marcescens* sont modérément affectées par la PYO et que *K. pneumoniae* est relativement résistante. En revanche, les résultats obtenus avec *S. typhimurium* s'opposent à ceux de Baron et al. (1989) qui ont suggéré que *S. typhimurium* est relativement résistante à la PYO.

De même, nous retrouvons des résultats similaires à ceux publiés par Chythanya et al. (2002) pour les souches de *Vibrio* testées. Ces auteurs ont suggéré que *P. aeruginosa* (souche marine I-2) inhibe la croissance de nombreux *Vibrio* grâce à une substance de faible poids moléculaire, soluble dans le chloroforme. Chythanya et al. (2002) avaient suggéré que cette molécule pouvait être la pyocyanine.

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*, ainsi que *X. campestris* et *B. cepaciae* présentent une DO_{600nm} sur milieu riche comprise entre 1,5 et 3 (**Figure 51-A**). De façon surprenante, la **figure 51-B** montre l'hypersensibilité à la PYO (100 µM) des souches appartenant au genre *Pseudomonas* (*P. stutzeri*, *P. putida*, et *P. fluorescens*). Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de Baron et Rowe (1981) qui avaient observé la résistance de plusieurs *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. perfectomarinus*, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*). Sur la base de ces observations, ces auteurs avaient associé la résistance à la PYO au genre *Pseudomonas*, ce que nos résultats remettent totalement en cause.

Comme attendu, la souche productrice de la PYO *P. aeruginosa* (PA14) est résistante. Ce résultat est en accord avec les travaux de Hassan et Fridovich (1980), Baron et Rowe (1981) et Hassett et al. (1992) qui ont observé la résistance de *P. aeruginosa* à la PYO.

La **figure 51-B** montre aussi que *X. campestris* est modérément affectée par la PYO et que *B. cepaciae* est résistante. L'absence de toxicité de la PYO vis-à-vis de *B. cepaciae* pourrait favoriser la coexistence de *B. cepaciae* avec *Pa* au sein des poumons des patients atteints de la mucoviscidose (Riedel et al., 2001; Lewenza et al., 2002).

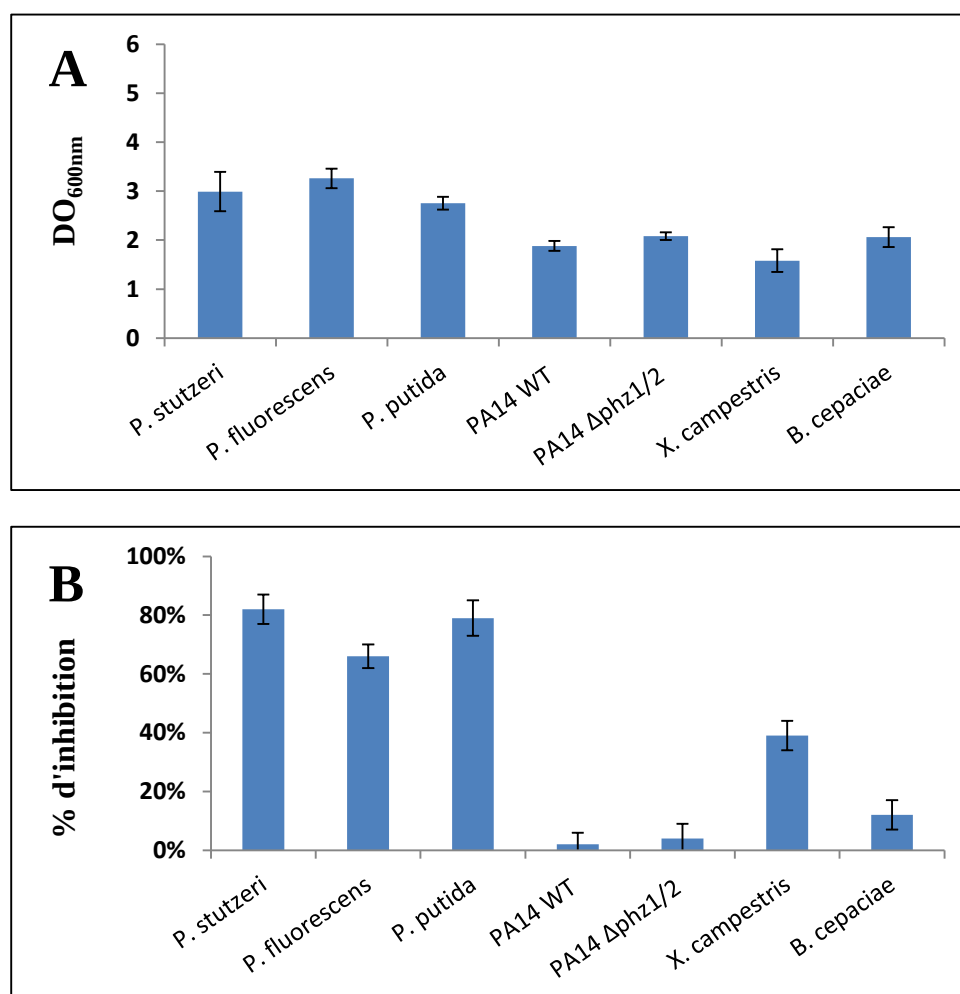


Figure 51: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram - appartenant au genre *Pseudomonas*, de *X. campestris* et de *B. cepaciae* sur milieu riche (BHI ou LB), après 24 h d'incubation à 30°C en aérobie.

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'effet de la PYO sur la croissance des bactéries Gram +/- sur milieu riche en aérobie montre que les bactéries Gram + sont généralement plus sensibles à la PYO que les bactéries Gram - et que la souche productrice *Pa* résiste à la PYO.

Pa utilise exclusivement la voie d'Entner-Doudoroff pour le catabolisme des sucres. Nous avons donc émis l'hypothèse que la résistance à la PYO pourrait être liée à l'utilisation de la voie d'Entner-Doudoroff pour le catabolisme du glucose.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries Gram + ne sont pas équipées de la voie d'Entner-Doudoroff, mais elles utilisent la glycolyse et/ou la voie des pentoses phosphates pour le catabolisme de sucres. Ces souches sont hypersensibles à la PYO hormis *E. faecalis*.

En revanche, nous avons constaté que certaines bactéries Gram - sensibles à la PYO (*S. typhimurium*, *V. nigripulchritudo*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *P. putida*, et *P. fluorescens*...) sont équipées de la voie d'Entner-Doudoroff. De plus, les effets de la PYO diffèrent chez *Xanthomonas campestris* (39% d'inhibition) et *P. aeruginosa* (résistante) malgré la similitude du métabolisme du glucose chez les deux espèces (Katznelson, 1955 ; Zagallo et Wang, 1967; Whitfield et al., 1982).

Il semble donc que l'équipement enzymatique pour le catabolisme du glucose ne permette pas d'expliquer la résistance ou la sensibilité à la PYO.

Nous avons ensuite envisagé que la résistance à la PYO pouvait être liée à la composition de la chaîne respiratoire et en particulier à la présence de cytochrome c oxydase. Les résultats obtenus suggèrent qu'il n'y a aucune corrélation entre le caractère oxydase +/- et la sensibilité des bactéries à la PYO. Des bactéries oxydase + (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *V. nigripulchritudo*, *V. splendidus*, *V. anguillarum* et *P. putida*) et d'autres oxydase - (*S. aureus*, *S. epidermidis*, et *S. typhimurium*) sont hypersensibles à la PYO alors que des bactéries oxydase + (*B. cepaciae*, PA14, *X. campestris*) et d'autres oxydase - (*K. pneumoniae* et *E. faecalis*) sont résistantes.

b. Sur milieu défini

Hassan et Fridovich (1980) puis Baron et Rowe (1981) ont observé que l'activité antibactérienne de la PYO dépend de la composition du milieu de culture. Hassan et Fridovich ont constaté un effet plus important de la PYO sur la croissance d'*E. coli* sur milieu défini par rapport à un milieu riche. Ils ont expliqué cet effet par le mécanisme d'action supposé de la PYO : génération d'un stress oxydatif et le fait que les bactéries ont une moindre possibilité d'y résister sur milieu défini.

Pour clarifier une nouvelle fois les données de la littérature, nous avons procédé à l'étude de l'effet de la PYO sur la croissance des différentes bactéries en aérobie en utilisant un milieu défini (milieu A).

La **figure 52** montre que toutes les bactéries Gram + testées ont une croissance très faible sur milieu défini ($DO_{600nm} \leq 0,2$ après 48 h d'incubation) et que la souche *M. luteus* ne se développe pas. Compte-tenu de cette très faible croissance, les résultats de l'effet de la PYO sur la croissance des bactéries Gram + sur milieu défini ne sont pas présentés.

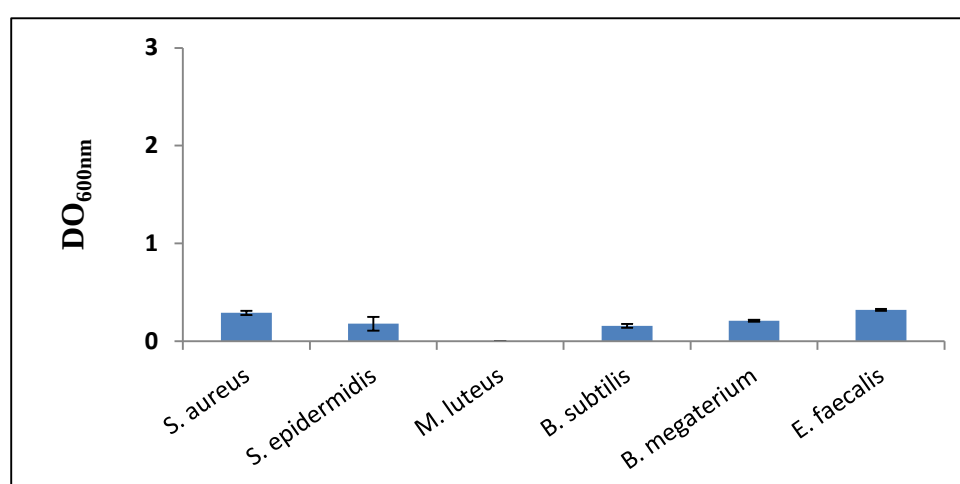


Figure 52: Croissance des bactéries Gram + sur milieu défini, après 48 h d'incubation à 30°C en aérobie.

En revanche, les bactéries Gram - ont une croissance plus importante sur milieu défini ($DO_{600nm} \geq 1$) (**Figure 53-A**).

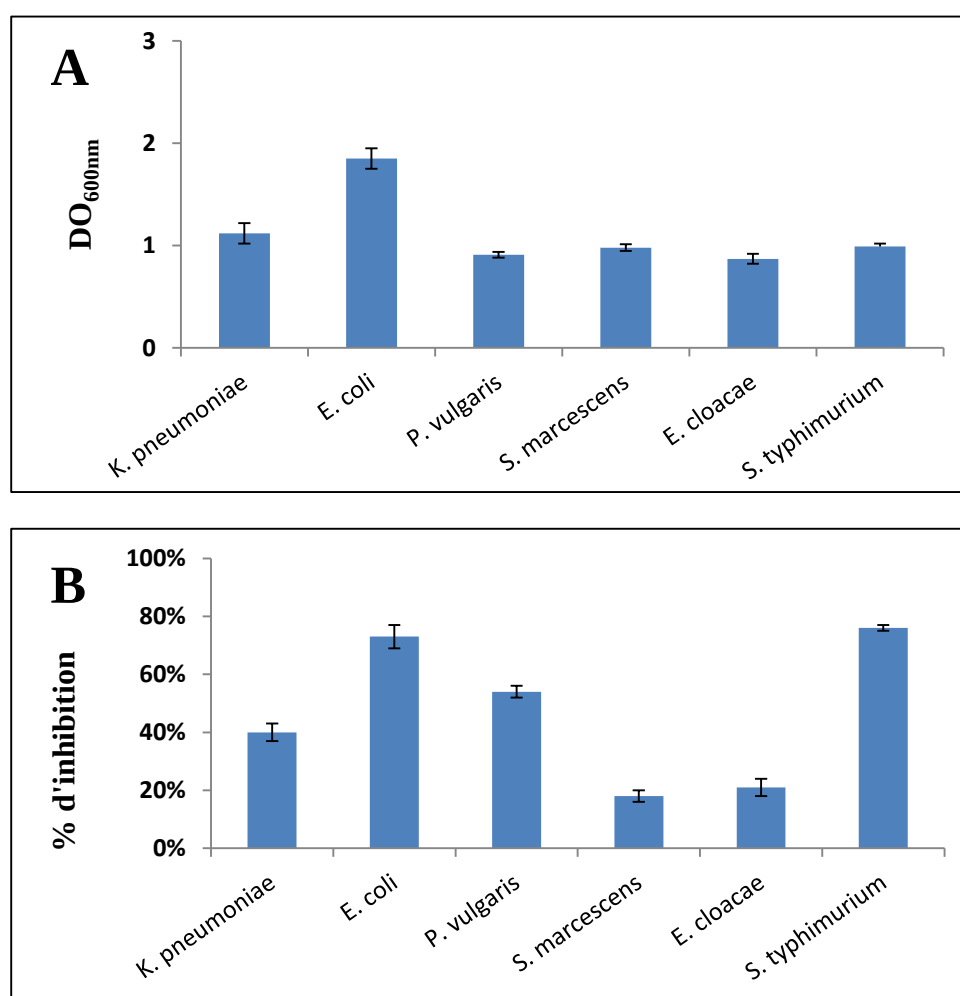


Figure 53: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram - sur milieu défini, après 48 h d'incubation à 30°C en aérobie.

Les résultats obtenus (**Figure 53-B**) révèlent que *S. marcescens* et *E. cloacae* sont plus résistantes à la PYO sur milieu défini que sur milieu riche (BHI) alors qu'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. vulgaris* sont plus sensibles et que *S. typhimurium* reste très sensible sur milieu défini, comme sur milieu riche (BHI).

Comme attendu, les *Pseudomonas* (*P. stutzeri*, *P. putida*, et *P. fluorescens*), *X. campestris* et *B. cepaciae* ont une croissance plus faible sur milieu défini (**Figure 54-A**) par rapport au milieu riche. La **figure 54-B** montre que *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *X. campestris* deviennent beaucoup plus résistantes à la PYO sur milieu défini que sur milieu

riche (BHI) et que *B. cepaciae* devient plus sensible (52 % d'inhibition sur milieu défini vs 12% sur milieu riche).

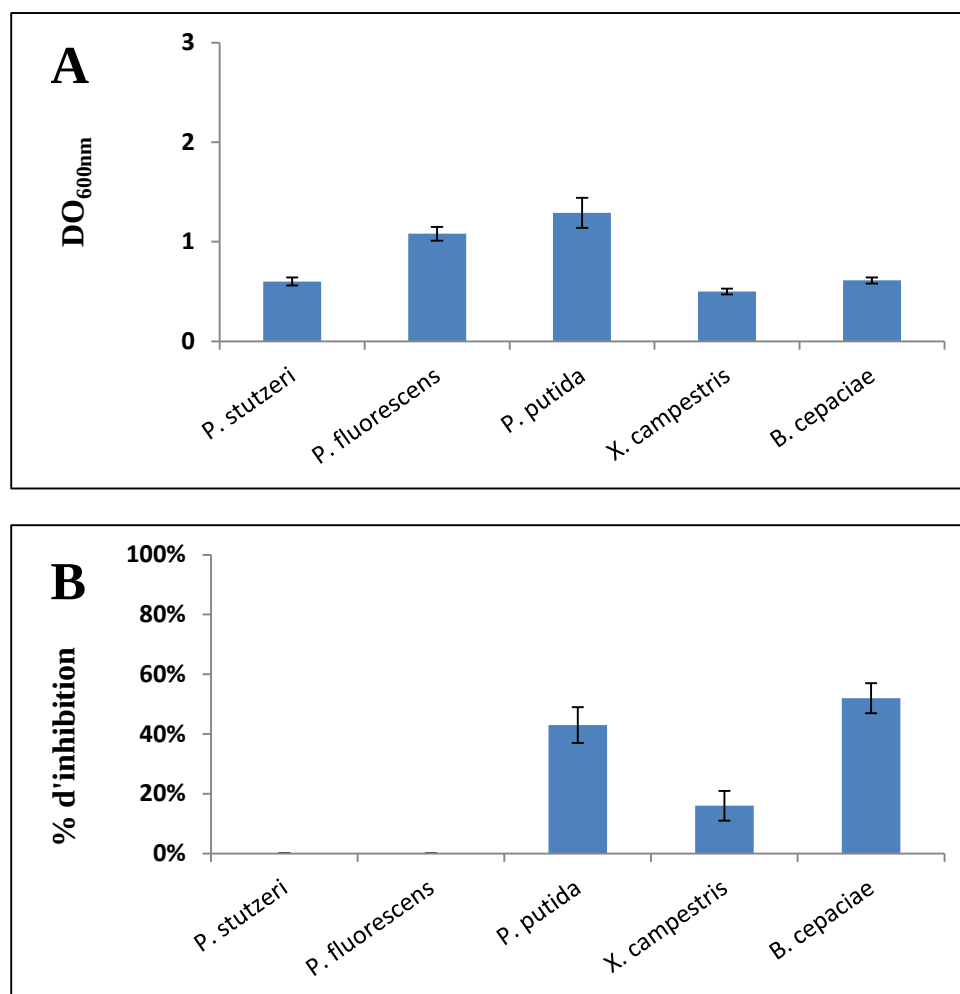


Figure 54: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) de bactéries Gram - appartenant au genre *Pseudomonas*, de *X. campestris* et de *B. cepaciae* sur milieu défini, après 48 h d'incubation à 30°C en aérobie.

L'ensemble des résultats obtenus sur milieu défini, confirme l'hypothèse que l'activité antibactérienne de la PYO dépend en partie de la composition du milieu de culture. Certains bactéries deviennent plus sensibles (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* et *B. cepaciae*) sur milieu défini par rapport au milieu riche et d'autres plus résistantes (*S. marcescens*, *E. cloacae*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *X. campestris*).

B. Sensibilité à la 1-hydroxyphénazine en aérobie.

La déméthylation de la PYO conduit à la formation d'une autre phénazine la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ). Il a été montré que la 1-hydroxyphénazine est toxique vis-à-vis des mitochondries isolées des cellules de mammifères (Armstrong et Stewart-Tull, 1971; Stewart-Tull et Armstrong, 1972) et vis-à-vis des plaquettes humaines (Muller et Sorrell, 1995).

Afin de tester l'hypothèse d'une éventuelle activité antibactérienne d'une autre phénazine produite par *P. aeruginosa*. Nous avons examiné l'effet de la 1-OHPHZ (100 μ M) sur la croissance de certaines souches bactériennes Gram +/- en aérobie sur milieu riche (BHI).

La **figure 55** montre que la 1-OHPHZ inhibe modérément la croissance de certaines bactéries Gram + (*S. aureus* et *S. epidermidis*). Par contre, la croissance d'autres bactéries Gram + est faiblement affectée par la 1-OHPHZ (*B. subtilis* et *B. megaterium*) et *M. luteus* est quasi-totalement résistante.

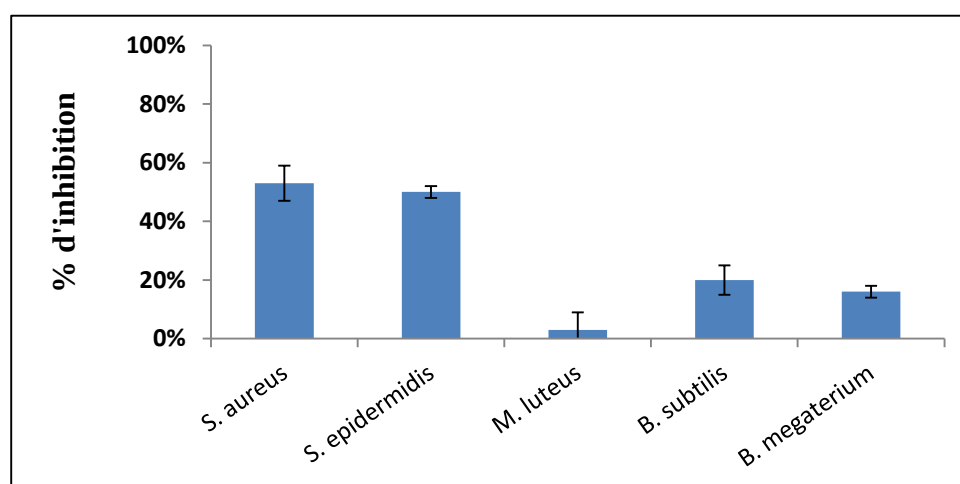


Figure 55 : Pourcentage d'inhibition de la croissance des bactéries Gram +, par la 1-OHPHZ (100 μ M) sur milieu riche (BHI) après 24 h d'incubation à 30°C en aérobie.

Nous avons également testé l'effet de la 1-OHPHZ sur la croissance de certaines bactéries Gram -. La **figure 56** montre que la croissance de la plupart des bactéries Gram -

testées est faiblement affectée par la 1-OHPHZ (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae* et *P. stutzeri*). Par contre, *S. typhimurium* est modérément sensible et *P. vulgaris* est quasi-totalement résistante.

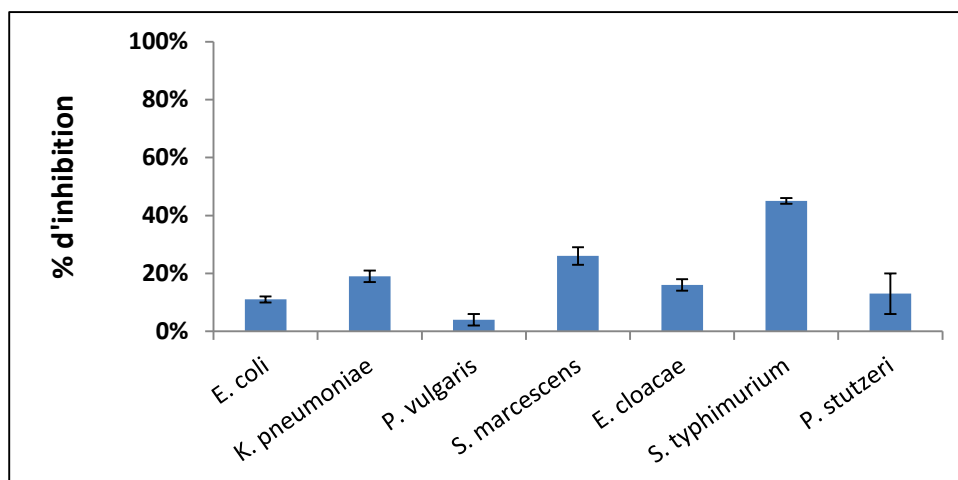


Figure 56: Pourcentage d'inhibition de la croissance des bactéries Gram -, par la 1-OHPHZ (100 µM) sur milieu riche (BHI) après 24 h d'incubation à 30°C en aérobie.

Nous constatons donc que la 1-OHPHZ comme la PYO exerce une activité antibactérienne préférentiellement dirigée contre les Gram +. Cependant, l'activité antibactérienne de la 1-OHPHZ est beaucoup moins importante que l'activité antibactérienne de la PYO. Compte-tenu du fait que les concentrations de 1-OHPHZ détectées dans les sécrétions de malades atteints de mucoviscidose sont bien plus faibles ($\approx 26 \mu\text{M}$) (Wilson et al., 1988) que celles de la PYO ($\approx 130 \mu\text{M}$) et que l'effet de la PYO est plus important ; nous pouvons en déduire que l'effet antibactérien lié à la sécrétion de phénazines chez *Pa* est principalement dû à la sécrétion de la PYO.

C. Sensibilité à la PYO en anaérobie

Certains auteurs suggèrent que l'activité antibactérienne de la PYO nécessite la présence d'O₂ et qu'elle est due à l'induction de stress oxydatif (Hassan et Fridovich, 1980). En revanche, d'autres auteurs suggèrent que la toxicité de la PYO vis-à-vis des bactéries est indépendante de l'O₂ mais nécessite une respiration active (Baron et Rowe, 1981; Baron et al., 1989).

De plus nous avons montré dans le chapitre précédent que la PYO exerce un effet inhibiteur sur la croissance de *S. cerevisiae* plus prononcé en anaérobie qu'en aérobie. Afin de déterminer si la PYO possède une activité antibactérienne en absence d'O₂, nous avons étudié l'effet de la PYO sur la croissance d'un large panel des bactéries Gram +/- en anaérobie, en utilisant deux milieux : BHI additionné de glucose et BHI additionné de nitrates et de glucose.

a. Sur milieu BHI additionné de glucose

La **figure 57-A** montre que toutes les bactéries testées se développent sur milieu BHI additionné de glucose ($DO_{600nm} \geq 0,9$) hormis *P. vulgaris* et *E. cloacae* qui présentent une croissance faible ($DO_{600nm} \leq 0,5$).

La **figure 57-B** montre que l'ensemble des souches testées présente une résistance importante à la PYO en condition de fermentation, à l'exception de *S. epidermidis* restée sensible, *E. faecalis* et *K. pneumoniae* étaient déjà très peu sensibles en aérobie sur milieu BHI.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hassan et Fridovich (1980), qui ont suggéré qu'*E. coli* résiste à la PYO en anaérobie. Ils sont aussi en accord avec les travaux de Baron et Rowe (1981) qui ont suggéré que la PYO exerce sa toxicité *via* la respiration et que la fermentation permet aux bactéries de se soustraire aux effets de la PYO.

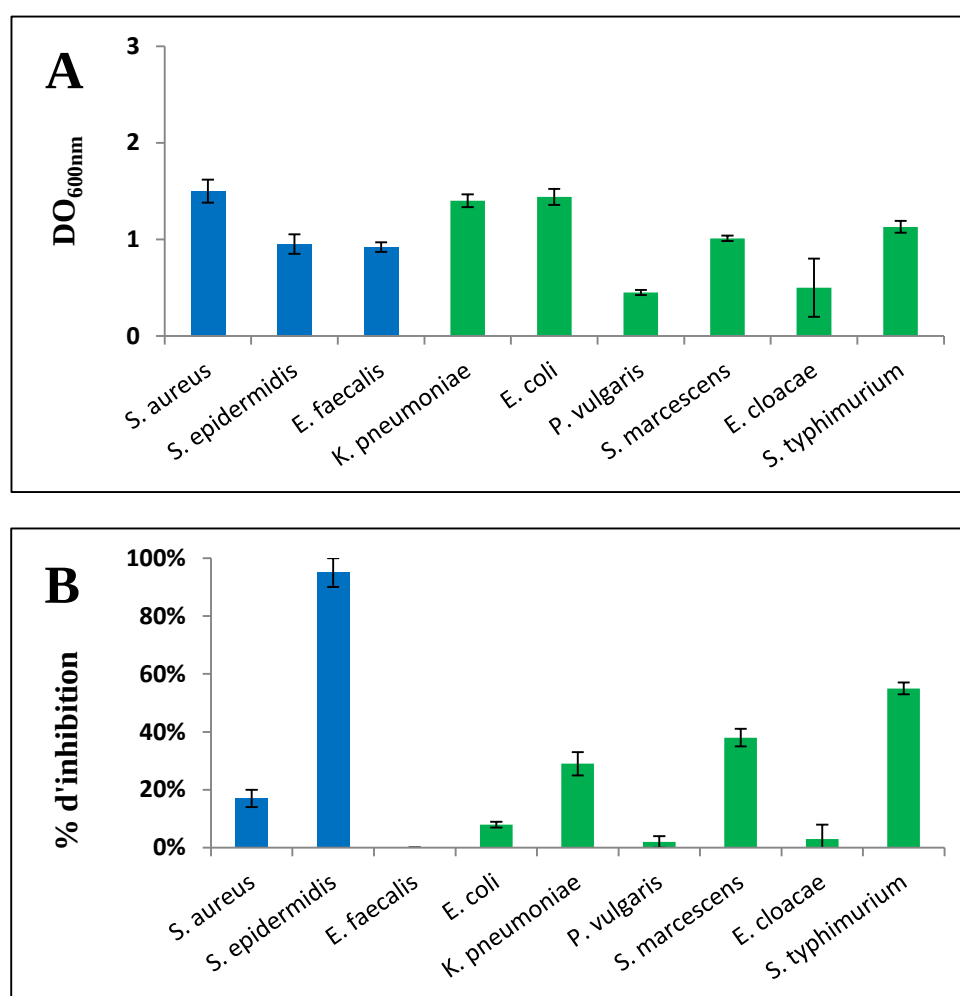


Figure 57: (A) Croissance et (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram + (en bleue) et des bactéries Gram - (en vert) sur milieu riche (BHI additionné de glucose 5 g/l), après 48 h d'incubation à 30°C en anaérobie.

b. Sur milieu BHI additionné de glucose et de KNO₃

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de la PYO sur la croissance des bactéries en anaérobie en présence de NO₃⁻, accepteur terminal d'électrons.

Toutes les bactéries testées se développent sur milieu BHI additionné de glucose et de KNO₃ (DO_{600nm} ≥ 0,7) (**Figure 58-A**).

La **figure 58-B** montre que *S. aureus* et *S. epidermidis*, capables de respirer les nitrates (Burke et Lascelles., 1975; Fuchs et al., 2007) sont sensibles à la PYO en anaérobiose, alors qu'*E. faecalis* incapable de respirer les nitrates est résistante à la PYO.

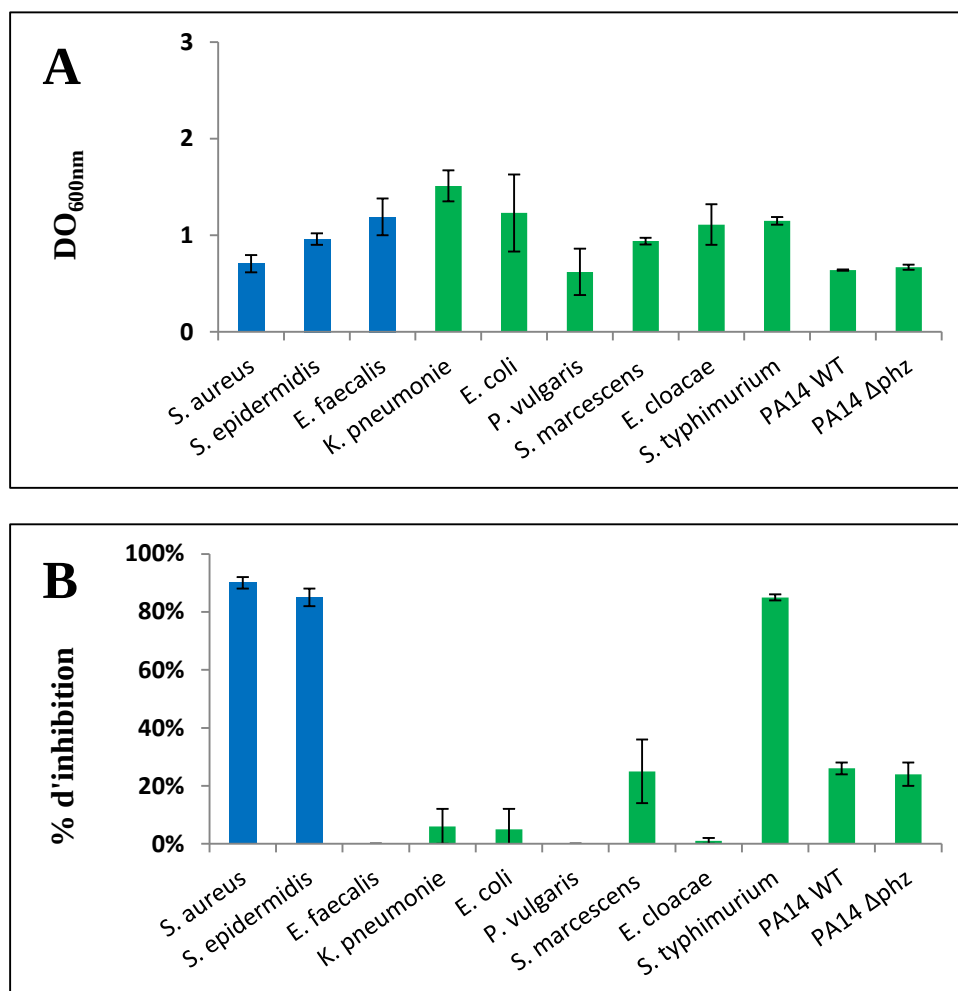


Figure 58 : (A) Croissance (B) Pourcentage d'inhibition de la croissance par la PYO (100 µM) des bactéries Gram + (en bleue) et des bactéries Gram - (en vert) sur milieu riche (BHI ou LB : additionné de glucose 5 g/l et de KNO₃ 50 mM), après 48 h d'incubation à 30°C en anaérobiose.

Concernant les bactéries Gram -, la **figure 58-B** (en vert) montre que toutes les bactéries Gram - testées sont résistantes à la PYO en anaérobiose en présence de KNO₃ à l'exception de *S. typhimurium* qui présente une sensibilité importante à la PYO comme en aérobie.

Les souches de *P. aeruginosa* testées (PA14 WT et PA14 Δ phz1-2) sont faiblement affectées par la PYO en anaérobie. Ce résultat est en accord avec les travaux de Baron et Rowe (1981) qui ont montré que *P. aeruginosa* résiste à la PYO quelles que soient les conditions de culture utilisées (aérobie ou anaérobie).

La plupart des bactéries résistent à la PYO en fermentation anaérobie. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus précédemment (chapitre I) avec la levure *S. cerevisiae*. Ceci suggère que la PYO exerce sa toxicité vis-à-vis des levures et des bactéries selon différents mécanismes. Dans le cas de bactéries (à l'exception de *S. epidermidis*), il semble que la présence d'une respiration active favorise la toxicité de la PYO.

3. Effet de la PYO sur la respiration bactérienne

Dans la partie précédente, nous avons étudié l'effet de la PYO sur la croissance des bactéries dans différentes conditions de culture. Nous avons constaté que la respiration semble accroître l'activité antibactérienne de la PYO.

Afin de tester l'hypothèse d'une interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire des bactéries, nous avons examiné l'effet direct de la PYO sur la respiration des trois bactéries sensibles à la PYO, deux bactéries Gram + : *S. aureus* (oxydase -) et *M. luteus* (oxydase +), et une bactérie Gram - : *E. coli* (oxydase -). Les flux spécifiques de consommation d'O₂ ont été calculés à partir de vitesses brutes mesurées à des états stationnaires (environ 15-20 minutes après l'addition de PYO).

A. Respiration des cellules en culture

Dans un premier temps, nous avons étudié la respiration (+/- PYO 100 μ M et/ou +/- KCN 1 mM) des cellules en culture. Les cellules ont été récoltées en phase de croissance et resuspendues dans leur surnageant de culture.

La **figure 59** montre que la PYO (100 μ M) n'a pas d'effet significatif sur le flux spécifique de consommation d'O₂ chez *S. aureus*. Cependant, la PYO inhibe légèrement la respiration d'*E. coli* (17%) et de *M. luteus* (18%) (**Figures 60 et 61**).

Comme attendu, le KCN (1 mM) inhibe fortement la respiration de trois bactéries testées (*S. aureus*, *M. luteus*, et *E. coli*). L'ajout de PYO après le KCN permet une forte reprise de la consommation d'O₂ surtout chez *S. aureus* et *E. coli* (**Figures 59 et 60**).

Cette forme de consommation d'O₂ résistante au cyanure observée après l'ajout de la PYO pourrait être expliquée de deux façons :

(i) Comme proposée par Hassan et Fridovich (1980), la PYO réduite par le NAD(P)H serait réoxydée en produisant des ROS. Ce phénomène ne serait détectable et peut-être favorisé qu'en présence de cyanure.

(ii) La PYO interagirait avec la chaîne respiratoire des bactéries, en amont des oxydases terminales. Cette hypothèse a été formulée par Baron et al. (1989). Elle pourrait également conduire à la production de ROS.

Cette forme de consommation d'O₂ est très faible chez la bactérie oxydase + *M. luteus*. Les quinol oxydases respiratoires pourraient donc jouer un rôle important dans ce phénomène.

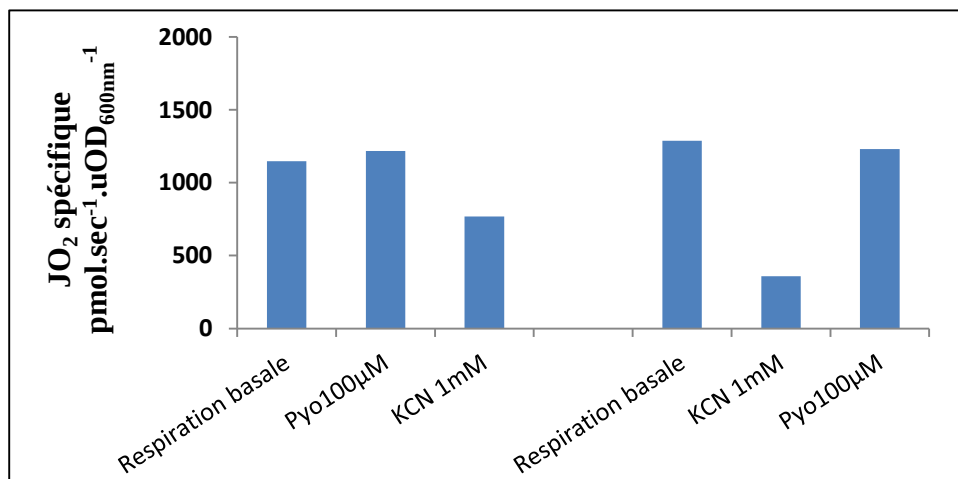


Figure 59: JO₂ spécifique des cellules de *S. aureus* (issues d'une culture sur BHI), et resuspendues dans leur propre surnageant de culture, respiration basale et après l'ajout successif : de PYO (100 µM) puis KCN (1 mM) ou de KCN (1 mM) puis PYO (100 µM).

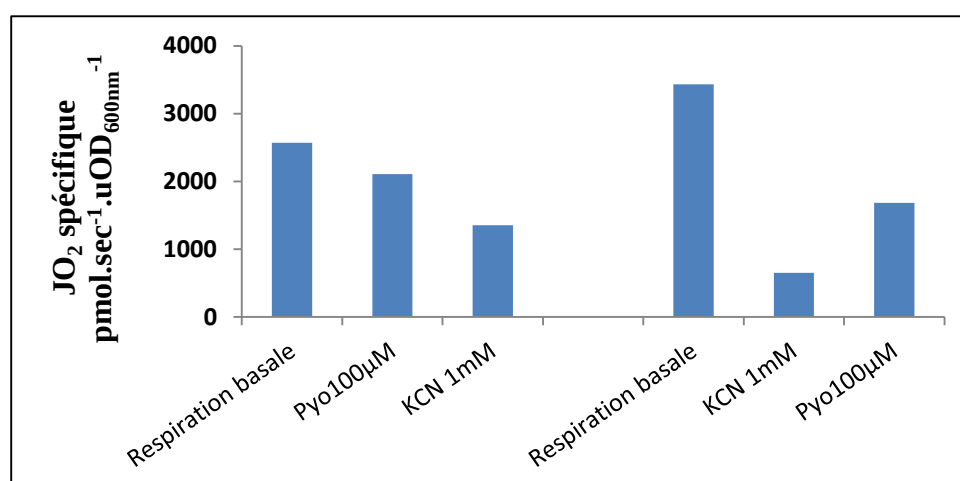


Figure 60: JO_2 spécifique des cellules d'*E. coli* (issues d'une culture sur BHI) et resuspendues dans leur propre surnageant de culture : respiration basale et après l'ajout successif : de PYO (100 μM) puis KCN (1 mM) ou de KCN (1 mM) puis PYO (100 μM).

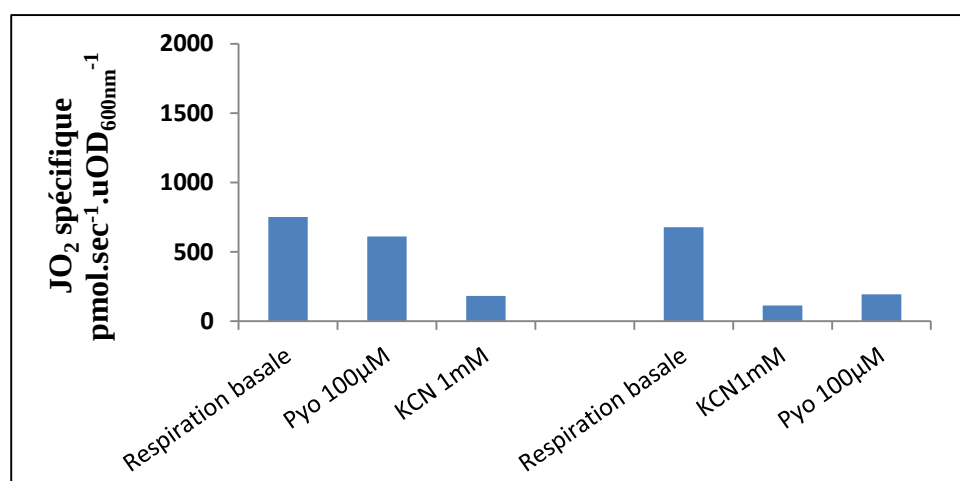


Figure 61: JO_2 spécifique des cellules de *M. luteus* (issues d'une culture sur BHI) et resuspendues dans leur propre surnageant de culture, respiration basale et après l'ajout successif : de PYO (100 μM) puis KCN (1 mM) ou après l'ajout successif de KCN (1 mM) puis PYO (100 μM).

B. Respiration des cellules lavées

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé l'effet de la PYO sur la respiration des cellules lavées. Les cellules ont été récoltées en phase de croissance, lavées puis

resuspendues dans du tampon. La respiration a tout d'abord été mesurée en absence de substrat ("respiration endogène") mais également en présence de glucose ou de succinate.

Comme attendu, la respiration des cellules lavées est beaucoup moins élevée que la respiration des cellules en culture. Une consommation d'O₂ résistante au cyanure a été observée après l'ajout de la PYO chez *E. coli* et chez *S. aureus* (**données non montrées**).

La respiration des cellules lavées a également été mesurée après l'ajout de succinate en excès (5 mM) ou de glucose en excès (5-10 mM) (**Figures 62, 63 et 64**).

Chez *E. coli*, comme le montre la **figure 62**, la PYO inhibe très légèrement la respiration sur succinate 5 mM (**figure A**) ou sur glucose 10 mM (**figure B**) (11% et 6 % d'inhibition, respectivement). Ces résultats s'opposent aux résultats de Baron et al (1989) qui ont montré que la PYO inhibe fortement la respiration d'*E. coli* en présence de glucose (80%) et modérément en présence de succinate (50%).

Comme attendu, le KCN (1 mM) bloque la respiration en présence de glucose ou de succinate. En revanche, l'ajout de KCN après la PYO n'inhibe que légèrement (20 %) la respiration en présence de glucose. L'ajout de PYO après KCN permet une forte reprise de la consommation d'O₂ surtout sur glucose.

Ces données vont plutôt dans le sens de la réduction de la PYO par le NADH (issu de la glycolyse et du cycle de Krebs) suivi d'une production de ROS. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Hassan et Fridovich (1980) qui ont suggéré que la toxicité de la PYO envers *E. coli* s'explique par l'induction de stress oxydatif suite à la réduction de la PYO par le NADH.

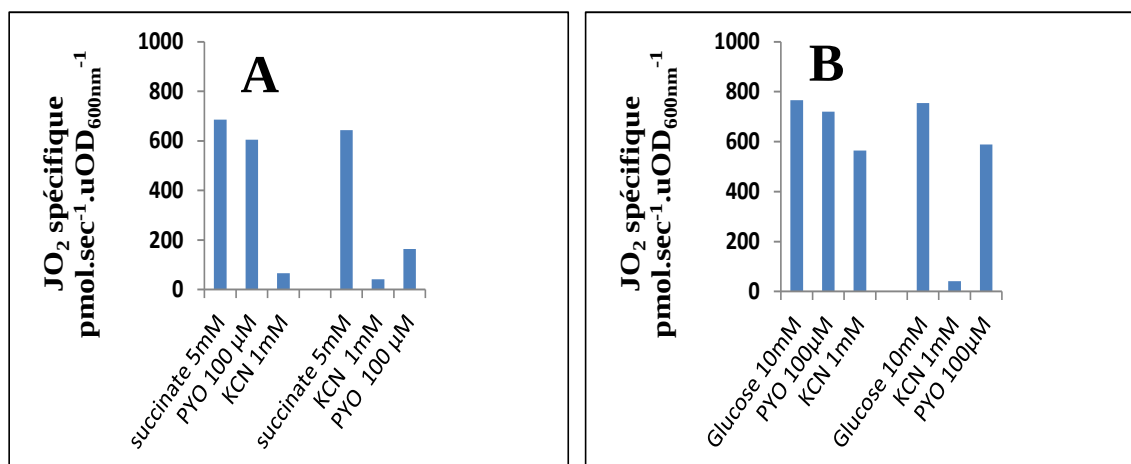


Figure 62: Effet de la PYO (100 μM) et du KCN (1 mM) sur le JO₂ spécifique des cellules lavées d'*E. coli* (issues d'une culture sur BHI) (A) en présence de succinate (5 mM) (B) en présence de glucose (10 mM).

Chez *S. aureus*, la **figure 63** montre que la respiration est beaucoup plus importante sur glucose que sur succinate. L'activité de la succinate déshydrogénase est faible lorsque *S. aureus* est cultivée sur glucose (Collins et Lascelles, 1962). Malgré cela, nous avons pu observer sur succinate que la PYO inhibe légèrement la respiration et qu'elle favorise la consommation d'O₂ résistante au cyanure.

Sur glucose, la PYO inhibe fortement la respiration. La PYO semble donc jouer le rôle de véritable poison respiratoire chez *S. aureus* dans cette condition.

Comme chez *E. coli*, l'ajout de PYO après le KCN permet une forte reprise de la consommation d'O₂ de *S. aureus* surtout sur glucose.

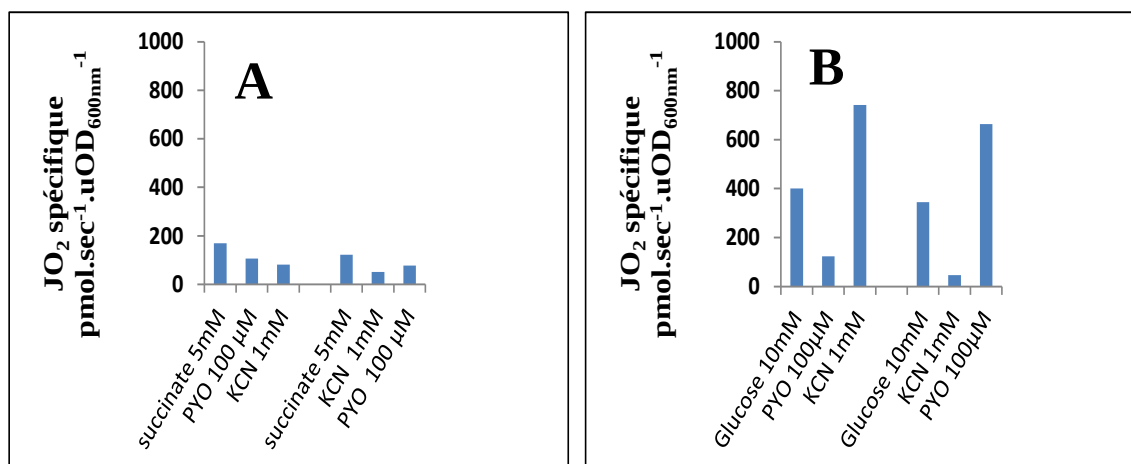


Figure 63: Effet de la PYO (100 μM) et du KCN (1 mM) sur le JO_2 spécifique des cellules lavées de *S. aureus* (issues d'une culture sur BHI), (A) en présence de succinate (5 mM) (B) en présence de glucose (10 mM).

Chez *M. luteus* (Figure 64), les effets de la PYO et du KCN sont retrouvés mais les respirations sont très faibles sur les deux substrats, succinate et sur glucose. *M. luteus* ne peut pas cataboliser le glucose (Young et al., 2010) et les cellules pourraient être dénuées de transporteurs de succinate.

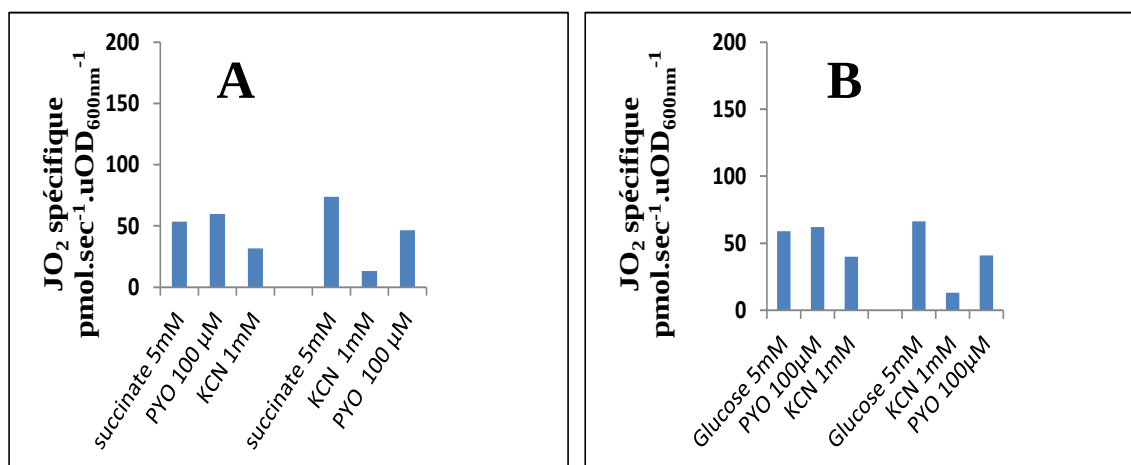


Figure 64: Effet de la PYO (100 μM) et du KCN (1mM) sur le JO_2 spécifique des cellules lavées de *M. luteus* (issues d'une culture sur BHI), (A) en présence de succinate (5 mM) (B) en présence de glucose (5 mM).

L'ensemble des résultats obtenus avec les cellules lavées montrent que la présence de PYO s'accompagne de l'apparition d'une consommation d'O₂ résistante au cyanure. Les effets sont plus prononcés sur glucose. La PYO semble jouer un rôle de véritable poison respiratoire chez *S. aureus*. Ces données suggèrent que (i) la PYO pourrait interagir avec la chaîne respiratoire en amont des oxydases terminales, et/ou (ii) la PYO pourrait capter les électrons au niveau du pool de NADH pour les transmettre directement à l'O₂ et ainsi produire des ROS.

Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de vérifier l'interaction éventuelle de la PYO avec la chaîne respiratoire de *S. aureus*.

Chez *S. aureus*, une forte consommation d'O₂ résistante au cyanure est observée en présence de PYO, mais elle est difficile à quantifier précisément car les flux d'O₂ ne sont pas stationnaires (**Figure 65**). Malgré cette contrainte, nous avons observé que cette forme de consommation d'O₂ est partiellement sensible au HQNO (inhibiteur du complexe III et de quinol oxydases). La PYO interagirait donc au moins en partie avec la chaîne respiratoire de *S. aureus* au niveau des quinones et/ou du complexe III.

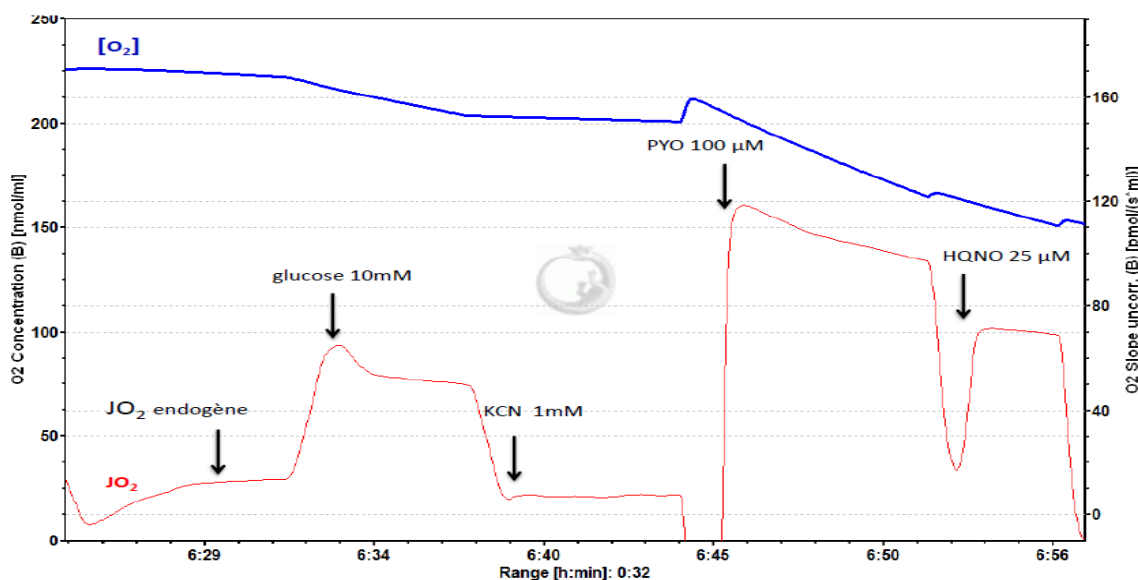


Figure 65: Suivi du JO₂ des cellules lavées de *S. aureus* (issues d'une culture sur BHI) après l'ajout successif de glucose (10 mM), KCN (1 mM), PYO (100 µM) et HQNO (25 µM). La concentration en O₂ est en bleu et la vitesse de consommation d'O₂ est en rouge.

Comme déjà décrit **figure 63B**, la **figure 66** montre que la PYO inhibe fortement la respiration de *S. aureus* sur glucose. La respiration résiduelle est très peu sensible à l'HQNO (25 μ M). L'HQNO est cependant actif car il inhibe fortement la respiration de *S. aureus* (86%) en l'absence de PYO. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec le cyanure, l'ajout de PYO après HQNO ne s'accompagne pas ou peu d'une reprise de la consommation d'O₂.

Ainsi, en présence de PYO, il n'y a pas ou peu de respiration HQNO-résistante. Ces résultats suggèrent que la PYO et l'HQNO interagissent avec la chaîne respiratoire au niveau d'un site commun, probablement le complexe III.

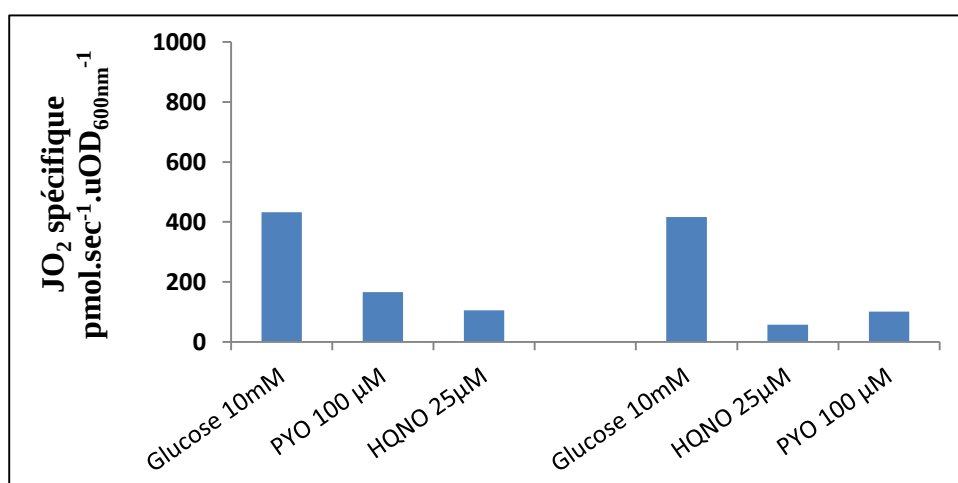


Figure 66: JO₂ spécifique des cellules lavées de *S. aureus* issues d'une culture sur BHI, après l'ajout successif : de glucose (10 mM), PYO (100 μ M) et HQNO (25 μ M) ou de glucose (10 mM), HQNO (25 μ M) et PYO (100 μ M).

Afin de tester l'hypothèse énoncée ci-dessus, nous avons procédé à l'étude de l'effet de la PYO sur la respiration de *S. aureus*, en utilisant le myxothiazol (inhibiteur spécifique du complexe III).

La **figure 67** révèle que le myxothiazol (25 μ M) inhibe fortement la consommation d'O₂ (71%) chez *S. aureus* et que l'ajout de la PYO après le myxothiazol n'a pas d'effet sur les flux de consommation d'O₂. Ces données vont également dans le sens de l'interaction de la PYO avec le complexe III de la chaîne respiratoire.

Nos données obtenues sur les cellules lavées de *S. aureus* confortent les hypothèses formulées par Voggu et al. (2006) sur la sensibilité de certains staphylocoques, et les mécanismes de résistance d'autres staphylocoques aux poisons respiratoires (cyanure, HQNO et PYO) produits par *P. aeruginosa*. Par des mesures directes de respiration, notre approche a permis de montrer l'interaction complexe III-dépendante de la PYO avec la chaîne respiratoire de *S. aureus*.

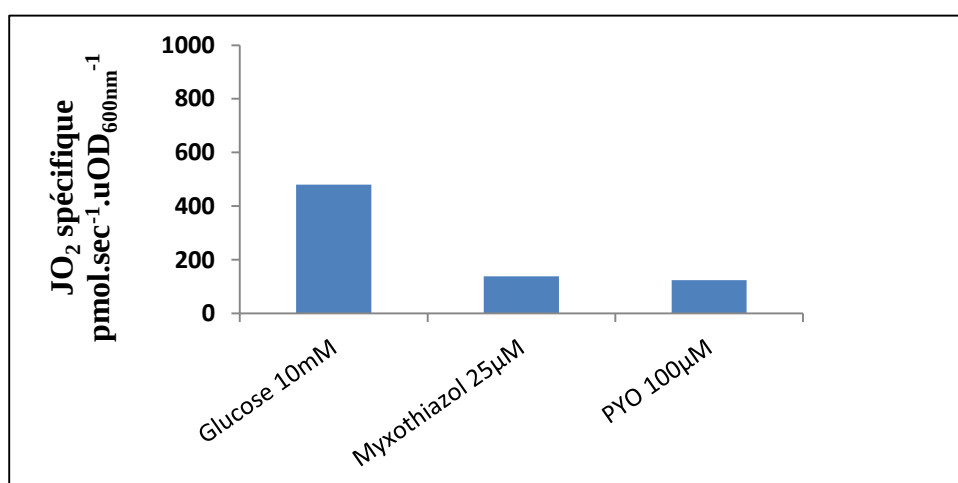


Figure 67: JO₂ spécifique des cellules lavées de *S. aureus* issues d'une culture sur BHI, après l'ajout successif de glucose (10 mM), myxothiazol (25 μM) puis PYO (100 μM).

Une fois réduite au niveau du complexe III, la PYO pourrait réagir avec l'O₂ pour former l'anion superoxyde, puis par dismutation du peroxyde d'hydrogène. Nous avons donc cherché à détecter le peroxyde d'hydrogène en utilisant de la catalase.

Nous avons suivi la consommation d'O₂ par les cellules lavées de *S. aureus* en présence de PYO, puis lorsque la totalité de l'O₂ a été consommée, nous avons rajouté de la catalase en excès. Nous n'avons pas détecté de libération d'O₂ (**données non montrées**). Ces résultats peuvent être expliqués de plusieurs façons : (i) Faible production de ROS par la PYO (ii) Les ROS produits par la PYO sont intracellulaires. Ces résultats s'opposent en apparence aux travaux de Hassan et Fridovich (1980) qui ont suggéré que la PYO stimule la production d'O₂⁻ et d'H₂O₂ à l'extérieur de la cellule cible, puis que l'H₂O₂ peut diffuser en retour à l'intérieur de la cellule. Cette hypothèse avait été émise pour expliquer la sensibilité

d'*E. coli* à la PYO. Il est possible que des mécanismes différents soient mis en œuvre chez les *staphylocoques*.

4. Conclusions sur l'activité antibactérienne de la PYO

L'étude de l'effet de la PYO sur la croissance d'un large panel de bactéries nous permet de conclure que :

- (i) les bactéries Gram + sont généralement plus sensibles à la PYO que les bactéries Gram –.
- (ii) les *Pseudomonas* (autres que *Pa*) peuvent être très sensibles à la PYO dans certaines conditions.
- (iii) en anaérobiose, la sensibilité est généralement moindre à l'exception de *S. epidermidis*.
- (iv) la sensibilité de *S. aureus* et dans une moindre mesure *S. typhimurium* est considérablement accrue par la présence de NO_3^- en anaérobiose.
- (v) il n'existe pas de relation simple entre la toxicité de la PYO et le caractère oxydase +/- ou les différents voies de dégradation des sucres.

La deuxième partie de cette étude a porté sur la caractérisation de l'effet direct de la PYO sur la respiration cellulaire de quelques bactéries dont la croissance est affectée par la PYO. Les premiers résultats obtenus sur les cellules en culture ont suggéré que la PYO ne bloque pas, à court terme, le transfert d'électrons des chaînes respiratoires de bactéries testées. Cependant, en présence de cyanure (KCN), un poison respiratoire puissant également produit par la bactérie *Pa*, la PYO permet une forte reprise de la consommation d' O_2 dans la quasi totalité des conditions expérimentales utilisées.

Ces premiers résultats ont été approfondis par des expériences sur des cellules lavées. Chez *S. aureus*, la PYO oxydée semble jouer le rôle d'un véritable poison respiratoire mais cet effet n'a été mis en évidence que sur les cellules lavées en présence de glucose. A ce jour, nous ne savons pas pourquoi la PYO n'inhibe pas à court terme la respiration de *S. aureus* en culture sur milieu riche. La diversité des voies de transfert d'électrons au sein de la

chaîne respiratoire branchée de *S. aureus* pourrait peut-être expliquer cette résistance apparente à la PYO.

Nous avons confirmé sur les cellules lavées des trois souches testées que la présence de PYO se traduit par l'apparition d'une consommation d'O₂ résistante au cyanure. Chez *S. aureus*, la PYO n'induit aucune forme de consommation d'O₂ si le cyanure est remplacé par du HQNO ou du myxothiazol (inhibiteur spécifique du complexe III). De plus, toujours chez *S. aureus*, la consommation d'O₂ résistante au cyanure est partiellement sensible à l'HQNO (autre poison respiratoire produit par *Pa*). Toutes ces données vont dans le sens d'une réduction de la PYO au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire de *S. aureus*. La PYO réduite pourrait se réoxyder dans le cytosol et/ou au niveau de la chaîne respiratoire.

Les effets combinés des inhibiteurs du complexe III (HQNO, myxothiazol) et de la PYO n'ont pas été déterminés sur les cellules lavées de *M. luteus* en raison de la faiblesse des flux d'O₂. En outre, *E. coli* est dénué du complexe III.

Enfin, dans ce chapitre nous avons confirmé la non toxicité de la PYO chez la bactérie productrice *Pa* et nous avons mis en évidence cette non toxicité chez le germe apparenté *Burkholderia cepacia*. Ceci pose la question des mécanismes de résistance à la PYO chez ces bactéries. De plus, la PYO semble jouer des rôles bénéfiques chez *Pa*. Ces rôles ne sont pas encore compris mais pourraient eux-aussi être dépendants d'une interaction avec la chaîne respiratoire (particulière chez *Pa*). Ces aspects sont développés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 :
Caractérisation de l'effet de la pyocyanine sur la
respiration de *P. aeruginosa*

Hassan et Fridovich (1979), Baron et al. (1981et1989) puis Hassett et al. (1992) ont montré que *P. aeruginosa* résiste à la PYO. Nous avons vérifié cette propriété. Hassan et Fridovich puis Baron et al. ont suggéré que cette résistance serait due à l'imperméabilité de la membrane cellulaire. Hassett et al. ont quant à eux expliqué cette résistance par le fait que *Pa* ne réduit que très lentement la PYO par manque d'une activité enzymatique de type "NADPH : pyocyanine oxydoréductase".

D'autres études (Friedheim 1931; Koley et al., 2011) et notamment les travaux de l'équipe de Dianne Newman (Price-Whelan et al., 2007) ont cependant mis en évidence que la PYO peut être réduite directement par *P. aeruginosa*. Néanmoins, le(s) site(s) et le mécanisme de réduction de la PYO chez *Pa* ne sont pas encore connus. Deux hypothèses ont été formulées :

- (i) La chaîne respiratoire de *Pa* est impliquée dans la réduction de la PYO (site(s) inconnu(s))
- (ii) La PYO est réduite par des agents réducteurs intracellulaires (NADH), indépendamment de la chaîne respiratoire de *Pa*.

Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives. Dans les deux cas, la production de PYO pourrait présenter un avantage physiologique pour *Pa* en plus de ses propriétés antibiotiques. La PYO pourrait notamment servir de navette pour le transport d'électrons en conditions de limitation d'O₂ (Price-Whelan et al. 2007).

Dans ce contexte et afin de tester ces hypothèses, nous avons examiné l'effet de la PYO sur la respiration de *Pa*, en utilisant l'oxygraphe haute résolution.

1. Description des mutants utilisés

Nous avons utilisé la souche PA14-UCBPP, un isolat clinique (Rahme et al., 1995), qui produit dix fois plus de PYO que la souche PAO1 lorsqu'elle est cultivée sur milieu LB (Dietrich et al., 2006). Récemment, il a été montré que la souche PA14 porte une mutation sur le gène *ladS* impliqué dans la transition entre infection chronique *versus* infection aiguë

(Mikkelsen et al., 2011). La souche PA14 présente une cytotoxicité accrue par rapport à la souche PAO1(Mikkelsen et al., 2011).

Plusieurs mutants de PA14 ont été utilisés et en particulier le mutant $\Delta phz1/2$ affecté dans la production des phénazines (Dietrich et al., 2006). Cette souche porte des mutations sur les deux opérons impliqués dans la synthèse des phénazines (*phzA1-G1* et *phzA2-G2*) et ne produit donc aucune phénazine (**Figure 68**).

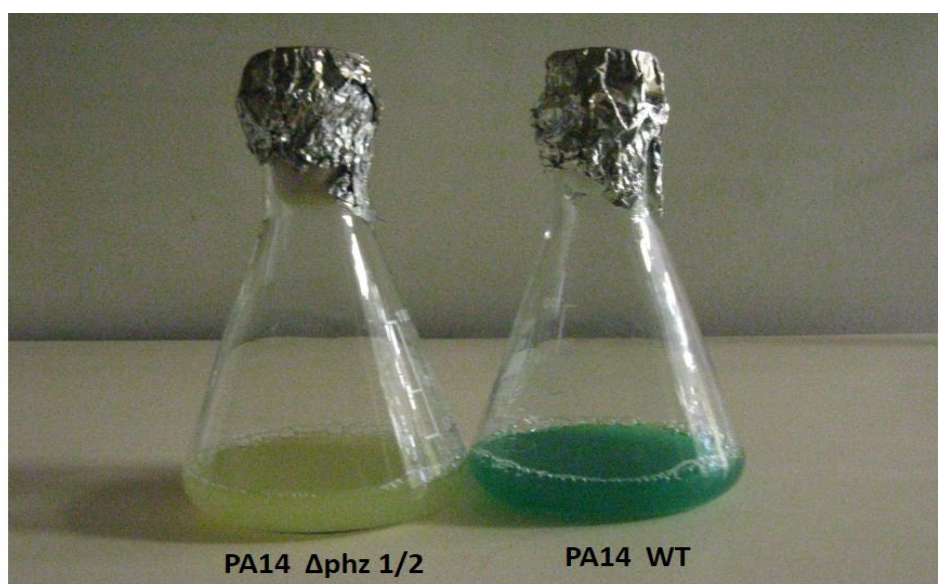


Figure 68 : Cultures de PA14 WT et PA14 $\Delta phz1/2$ en phase stationnaire de croissance (souches cultivées sur milieu MOPS-succinate 40 mM en aérobiose).

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Dianne Newman (Caltech, USA), une série de mutants respiratoires a été construite. Ces différents mutants sont affectés au niveau du complexe III (bc_1) et des oxydases terminales de la chaîne respiratoire (**Figure 69**) :

- PA14 $\Delta fbcC$, mutant affecté au niveau d'une sous-unité du complexe bc_1 (Liberati et al., 2006)
- PA14 $\Delta CyoABCD$, mutant affecté au niveau de la quinol oxydase terminale bo_3
- PA14 $\Delta CioAB$, mutant affecté au niveau de la quinol oxydase terminale bd ou CIO

- Le double mutant PA14 Δ CioAB Δ CyoABCD, mutant affecté au niveau de deux quinol oxydases terminales CIO et bo_3 .

Les différents mutants respiratoires de PA14 ont été construits à la fois dans le fond génétique WT (PA14 Δ fbcC, PA14 Δ CyoABCD, PA14 Δ CioAB et PA14 Δ CioAB Δ CyoABCD) et dans le fond génétique Δ phz1/2 (PA14 Δ phz1-2 Δ fbcC, PA14 Δ phz1-2 Δ CyoABCD, PA14 Δ phz1-2 Δ CioAB et PA14 Δ phz1-2 Δ CioAB Δ CyoABCD). Le mutant Δ phz1/2 et ses dérivés ne synthétisent aucune phénazine. Il est ainsi plus aisé de déterminer les effets de la PYO exogène.

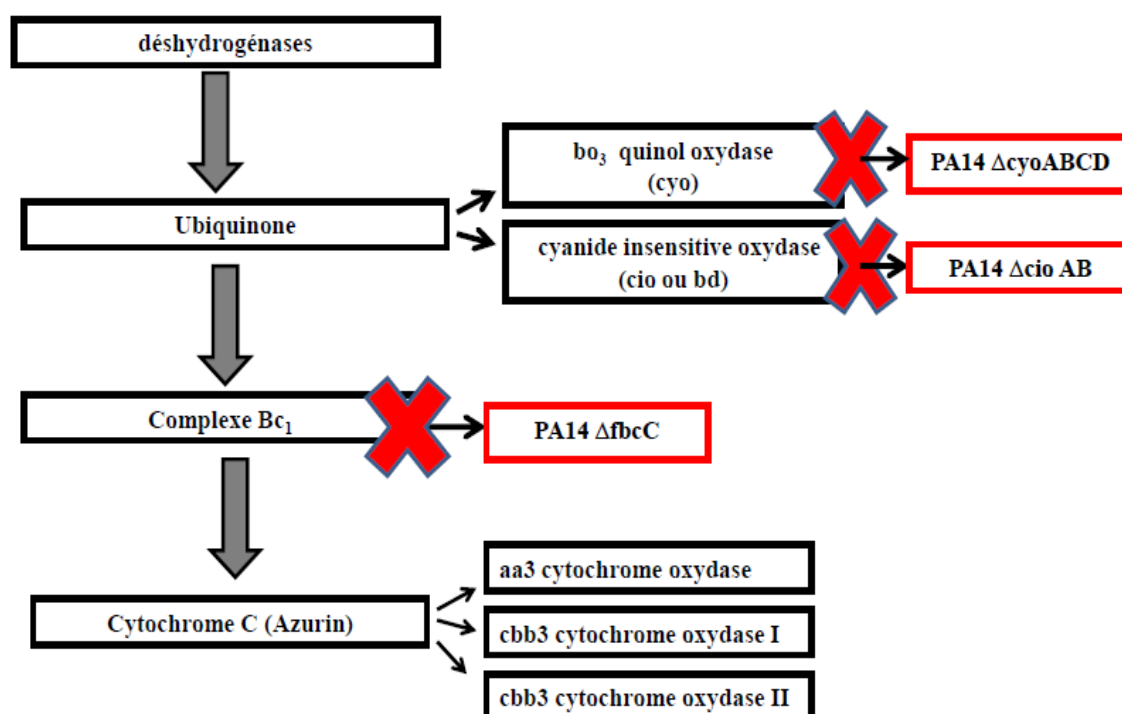


Figure 69: Diagramme de la chaîne respiratoire de *P. aeruginosa*, et des mutants utilisés lors de cette étude.

2. Cinétiques de croissance

La croissance de PA14 WT, PA14 Δ phz1/2 et les différents mutants, a été suivie pendant ~ 16 h sur milieu MOPS-succinate (40 mM).

Les mutants Δ phz, Δ cioAB, Δ cyoABCD et Δ cioAB Δ cyoABCD présentent une croissance similaire à la souche parentale WT. De même pour les mutants du fond génétique Δ phz (**Figure 70**).

Le mutant Δ fbcC est fortement affecté dans sa croissance (**Figure 70**). Ce mutant dénué de complexe III fonctionnel est probablement très affecté dans ses capacités de synthèse d'ATP.

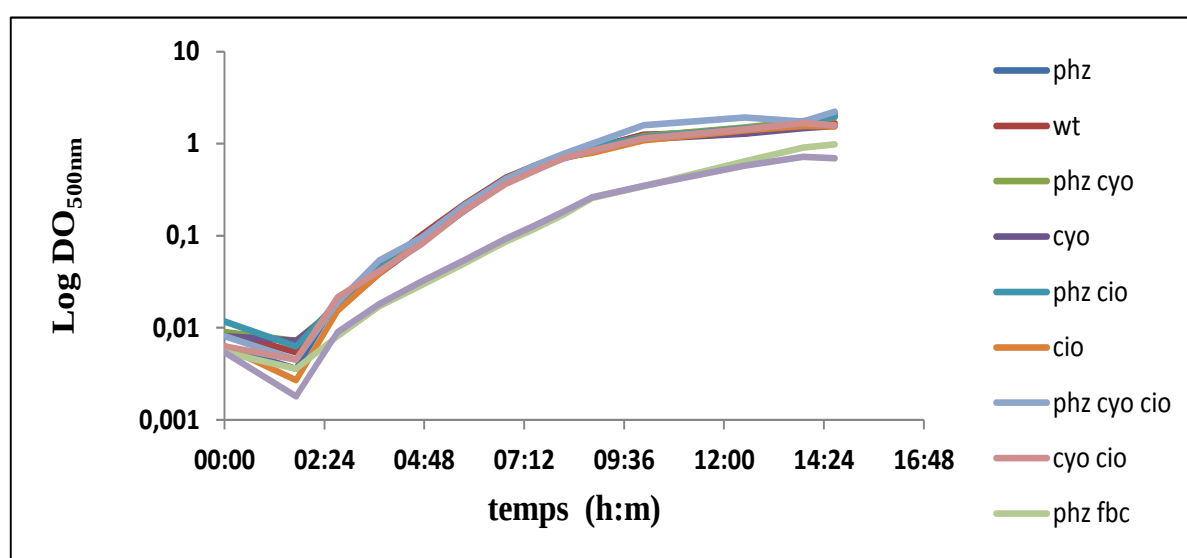


Figure 70: Cinétique de croissance de PA14 WT, PA14 Δ phz1/2 et des différents mutants sur milieu MOPS-succinate (40 mM) à 37°C.

3. Suivi du taux de réduction de la PYO par PA14

Nous avons envisagé l'hypothèse d'une implication de certains composants de la chaîne respiratoire dans la réduction de la PYO chez *Pa*. Le taux de réduction de la PYO

exogène par la souche parentale et les différents mutants de la chaîne respiratoire de PA14 a été mesuré dans un premier temps par l'équipe de Dianne Newman.

Le fond génétique $\Delta phz1-2$ a été privilégié. En effet, la souche sauvage PA14 WT produit la PYO et d'autres phénazines à des concentrations variables selon le stade de croissance, d'où d'éventuelles difficultés d'interprétation des résultats.

La **figure 71** montre que la réduction de la PYO est en apparence nulle chez la souche $\Delta phz \Delta fbcC$. Les autres souches ont des niveaux comparables de taux de réduction de la PYO. Ces résultats suggèrent que le complexe bc_1 (complexe III) de la chaîne respiratoire de PA14 est impliqué dans la réduction de la PYO chez PA14. Cette hypothèse a été récemment formulée par Koley et al. (2011) pour expliquer le rôle de la PYO dans la formation du biofilm chez *Pa*.

Cependant, la croissance de la souche $\Delta phz \Delta fbcC$ et donc sa physiologie globale sont très affectées (**Figure 70**). Les données de réduction de la PYO sont donc à considérer avec prudence.

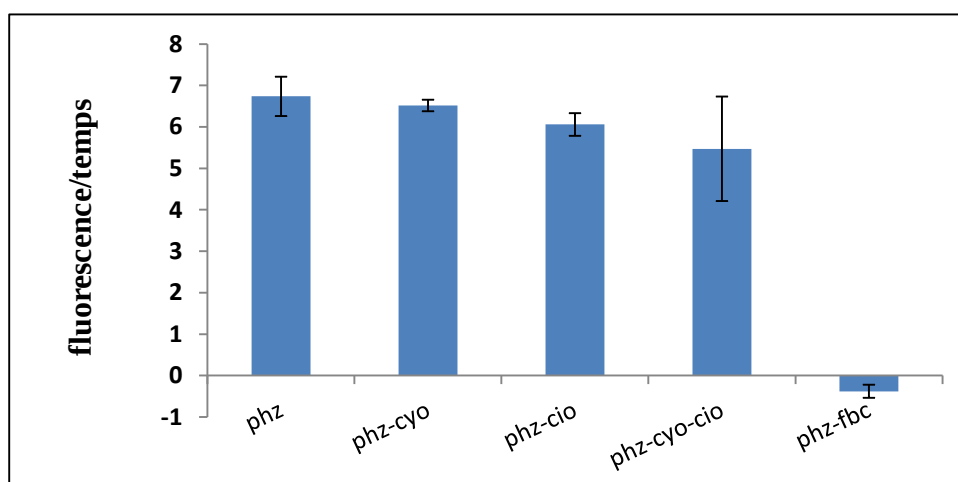


Figure 71: Taux de réduction de la PYO (100 μ M) obtenu par suivi de fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 330 nm et $\lambda_{émission}$ = 490 nm) chez la souche PA14 $\Delta phz1-2$ et les différents mutants de la chaîne respiratoire cultivés sur milieu MOPS-succinate (40 mM).

4. Effet de la PYO sur la respiration de PA14

Nous avons ensuite étudié l'effet de la PYO sur la respiration de PA14 et des mutants. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude préliminaire en utilisant l'oxygraphe classique (4 chambres) et en utilisant deux souches PA14 WT et PA14 Δ phz. Dans un deuxième temps, nous avons procédé à des analyses oxygraphiques haute résolution.

A. Respiration des cellules en culture

Les respirations ont été mesurées par oxygraphie classique après culture sur milieu MOPS-succinate (40 mM) et récolte des cellules à deux stades de croissance :

- le stade pré-phénazine (pré-phz), c'est-à-dire avant la production de la PYO ($\approx$ 3 h de culture)
- le stade post-phénazine (post-phz), après l'apparition de la PYO dans la culture de PA14 WT ($\approx$ 8 h de culture).

Comme le montre la **figure 72**, la respiration des cellules est plus élevée au stade pré-phz qu'au stade post-phz. De plus, PA14 présente une forte respiration spécifique et l'ajout de 100 μ M PYO n'a pas d'effet significatif sur la vitesse de consommation d'O₂ pour les deux stades pré-phz et post-phz, et pour les deux souches WT et Δ phz.

Ces résultats peuvent être expliqués soit par l'absence d'interaction entre la PYO et la chaîne respiratoire de *Pa* soit par une respiration spécifique très importante masquant un effet "discret" de la PYO. A noter qu'une telle hypothèse avait déjà été énoncée de longue date par Friedheim (1931) ; l'auteur avait observé à l'aide d'un manomètre de Warburg qu'une respiration élevée pouvait masquer les effets de la PYO sur la respiration de *Pa*.

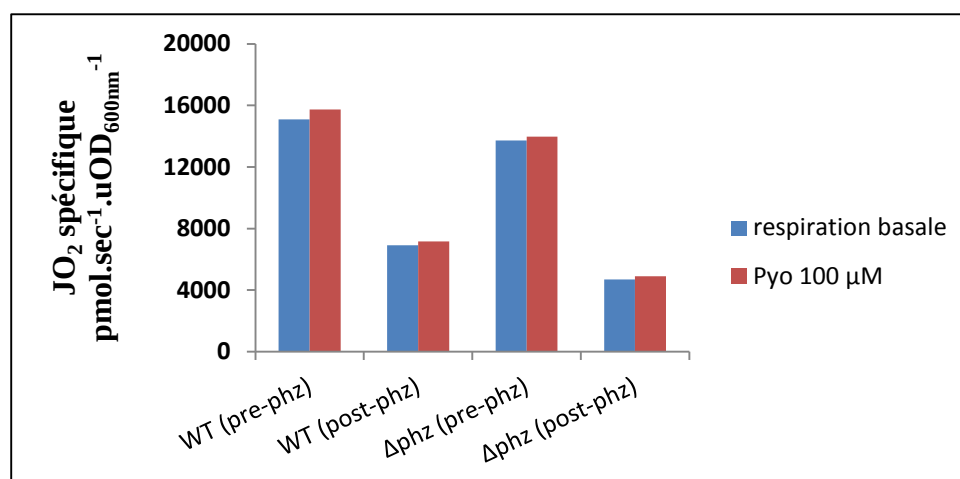


Figure 72: JO_2 spécifique de cellules de PA14 WT et PA14 Δphz cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) et resuspendues dans leur surnageant de culture: respiration basale et après l'ajout de 100 μ M PYO. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

Des résultats similaires ont été obtenus lors de la culture des cellules en aérobie sur milieu LB. L'ajout de 100 μ M PYO n'a aucun effet sur la respiration de *Pa*, pour les deux stades pré-phz et post phz, et pour les deux souches WT et Δphz (**données non montrées**).

B. Respiration des cellules lavées

Les effets de la PYO sur les cellules lavées de PA14 (PA14 WT et Δphz) ont été déterminés à différentes vitesses de respiration par oxygraphie haute résolution, en présence de substrats (succinate, lactate...) ou non (« respiration endogène »).

a. Effet de la PYO sur la respiration endogène (après culture sur succinate)

Après culture aérobie sur milieu MOPS-succinate et récolte en fin de phase stationnaire, nous avons déterminé l'effet de la PYO sur la respiration endogène des cellules lavées.

Logiquement, la respiration des cellules lavées (" JO_2 endogène") est beaucoup moins élevée que la respiration des cellules resuspendues dans leur surnageant de culture. L'addition de PYO (100 μ M) stimule la consommation d' O_2 pour les deux souches WT et

Δphz (**Figure 73**). Nous pouvons donc penser que la PYO peut être réduite soit directement par le NADH soit au niveau de la chaîne respiratoire de PA14 et que la PYO réduite transfère les électrons à l' O_2 .

L'effet de la PYO est cependant plus important chez le mutant Δphz que chez la souche sauvage WT. Or, il a été montré que le mutant Δphz accumule plus de NADH en phase stationnaire (Price-Whelan et al., 2007). Ces données renforcent donc l'hypothèse de la réduction de PYO *via* le NADH cytosolique, mais elles ne démontrent pas l'absence d'interaction de la PYO avec la chaîne respiratoire. A ce stade, un dosage rigoureux du NADH intracellulaire des cellules lavées des deux souches WT et Δphz aurait pu être envisagé. Pour des raisons techniques et de temps, nous n'avons pas effectué ce dosage.

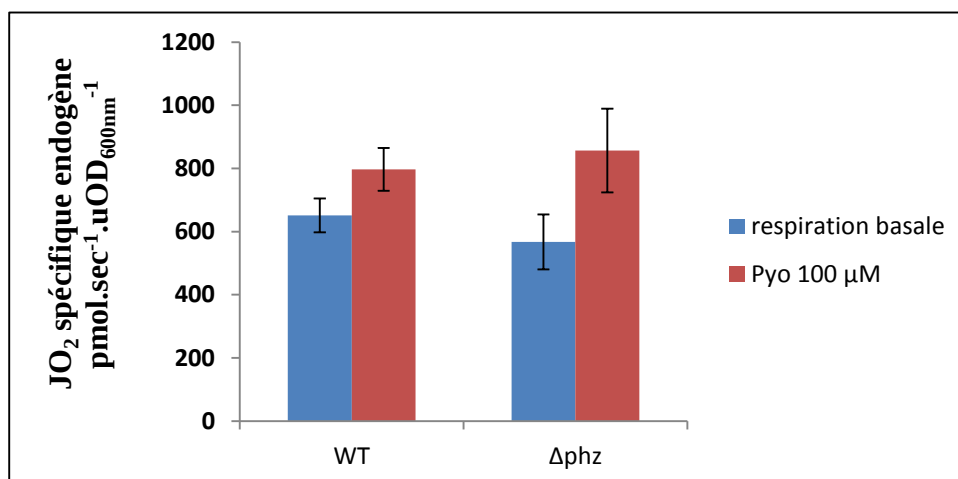


Figure 73: JO_2 spécifique endogène des souches PA14 WT et PA14 Δphz (cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout de PYO 100 μM .

b. Effet de la PYO sur la respiration endogène (après cultures sur glucose et sur lactate)

Afin de tester si les effets de la PYO sont fonction de l'équipement enzymatique de la chaîne respiratoire de PA14, nous avons étudié l'effet de la PYO sur la respiration endogène après culture de PA14 sur glucose et sur lactate.

Les résultats montrent que la PYO (100 μ M) stimule de façon similaire la respiration endogène des cellules cultivées sur succinate, glucose ou lactate (**Figure 74**).

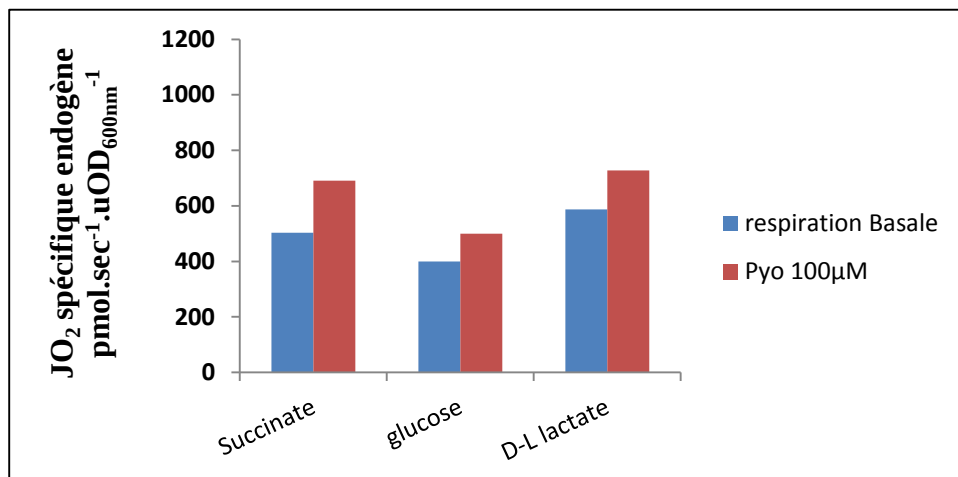


Figure 74: JO₂ spécifique endogène de la souche PA14 Δ phz cultivée respectivement sur milieu MOPS-succinate, MOPS-glucose et MOPS-lactate : respiration basale et après l'ajout de 100 μ M PYO.

c. Effet de la PYO sur la respiration sur succinate ou sur D-L lactate (après culture sur succinate ou sur D-L lactate)

Les résultats montrent que le succinate (1 mM) stimule fortement la respiration des cellules lavées de Δ phz issues de culture sur succinate, et que l'ajout de PYO après le succinate n'a pas d'effet significatif sur le flux de consommation d'O₂ (**Figure 75**). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des cellules resuspendues dans leur surnageant de culture.

Ces données ont été complétées par des essais sur des cellules lavées issues de culture sur D-L Lactate. La respiration endogène de ces cellules est fortement stimulée par l'ajout de D-L lactate exogène (1 mM) ou par l'ajout de succinate (1 mM). L'ajout de PYO cependant n'a pas d'effet sur la respiration de PA14 Δ phz dans ces conditions (**données non montrées**).

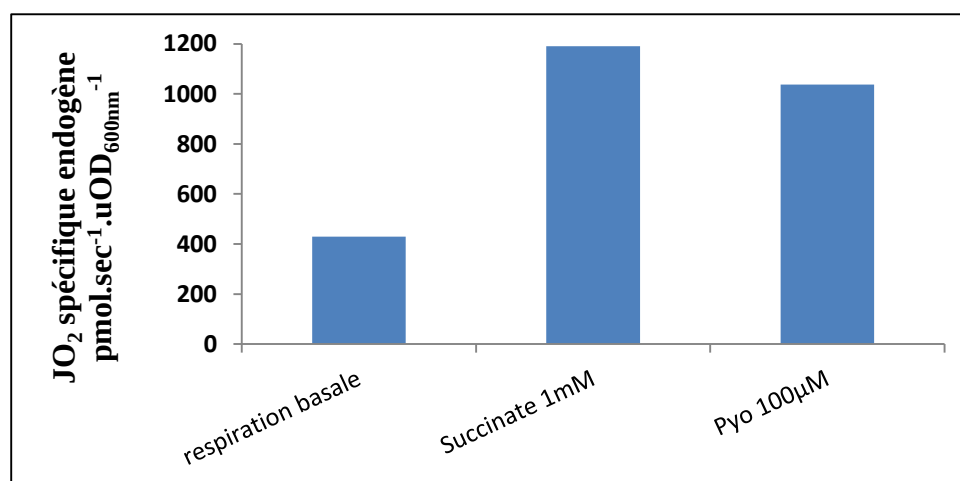


Figure 75 : JO₂ spécifique endogène de la souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale, et après l'ajout successif de succinate (1 mM) puis de PYO 100 μ M. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 expériences).

Prises dans leur ensemble, ces données montrent que la PYO stimule la respiration de *Pa* lorsque les transferts d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire sont ralentis (« phase stationnaire, respiration endogène »). De telles conditions de vie ralenties sont par exemple caractéristiques de la vie en biofilm.

C. Effet de la PYO sur la respiration des mutants de la chaîne respiratoire de PA14

Afin de tester, si la PYO peut être réduite au niveau de sites spécifiques de la chaîne respiratoire de PA14, nous avons utilisé une série de mutants respiratoires et un panel de poisons respiratoires. Nous nous sommes focalisés sur la condition "cellules lavées", condition dans laquelle une stimulation de la respiration par la PYO a été observée pour les deux souches PA14 WT et le mutant Δ phz. Les cellules cultivées sur milieu MOPS-succinate ont été récoltées en phase stationnaire (phase post-phénazine, 12 h de culture).

Les **figures 76, 77 et 78** montrent que la PYO stimule la respiration d'une façon similaire chez les différents mutants : Δ cio (19%), Δ cyo (27%), Δ cio Δ cyo (21%) et la souche parentale WT (23%). De même, il n'y a pas de différence significative entre les mutants Δ phz

Δ Cio (38%), Δ phz Δ Cyo (35%), Δ phz Δ Cio Δ Cyo (37%) et la souche parentale Δ phz (39%). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par l'équipe de Dianne Newman et suggèrent que les quinol oxydases terminales cyoABCD et cioAB ne sont pas impliquées dans la réduction de la PYO chez PA14.

L'expression de l'oxydase cyoABCD est réduite dans les conditions favorisant la production de la PYO par *Pa* [lors de l'entrée en phase stationnaire ou à de faibles teneurs en oxygène (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007)]. Il est donc logique que cette oxydase ne joue pas un rôle dans la réduction de la PYO. L'oxydase cioAB est quant à elle induite par le cyanure et ce dernier est produit par *Pa* dans les conditions favorisant également la production de la PYO [lors de l'entrée en phase stationnaire (Schobert et Jahn, 2010) et lorsque la disponibilité en oxygène est limitée]. Nous avons donc présupposé que cette oxydase pourrait jouer un rôle dans la réduction de la PYO, mais nos résultats montrent le contraire.

La PYO n'a pas d'effet significatif sur la respiration endogène des mutants Δ fbcC (7%) et Δ phz Δ fbcC (13%) (**Figure 79**). Ces données renforcent l'hypothèse de l'implication du complexe bc₁ (complexe III) de la chaîne respiratoire de PA14 dans la réduction de la PYO. Encore une fois, ces données doivent être considérées avec prudence puisque le mutant Δ fbcC est très affecté dans sa croissance.

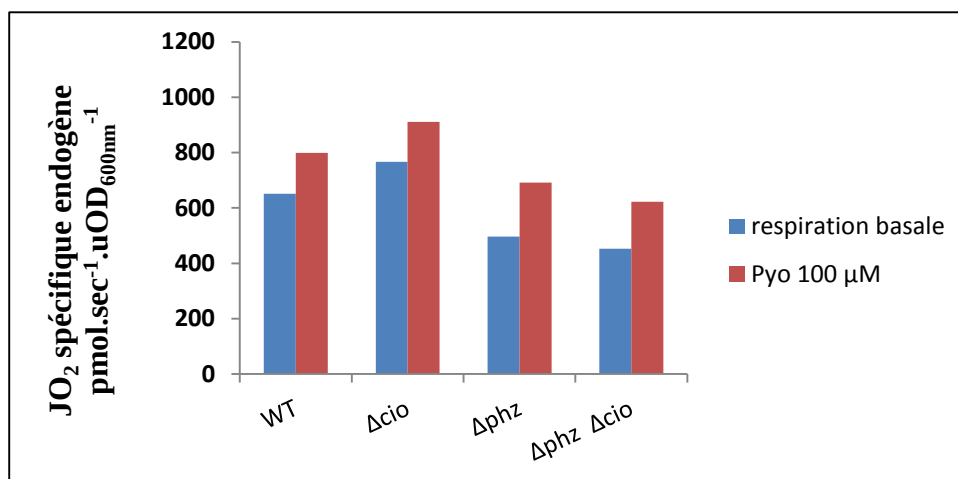


Figure 76: JO₂ spécifique endogène des souches WT, Δ phz, Δ cio et Δ phz Δ cio, cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout de PYO 100 μM. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

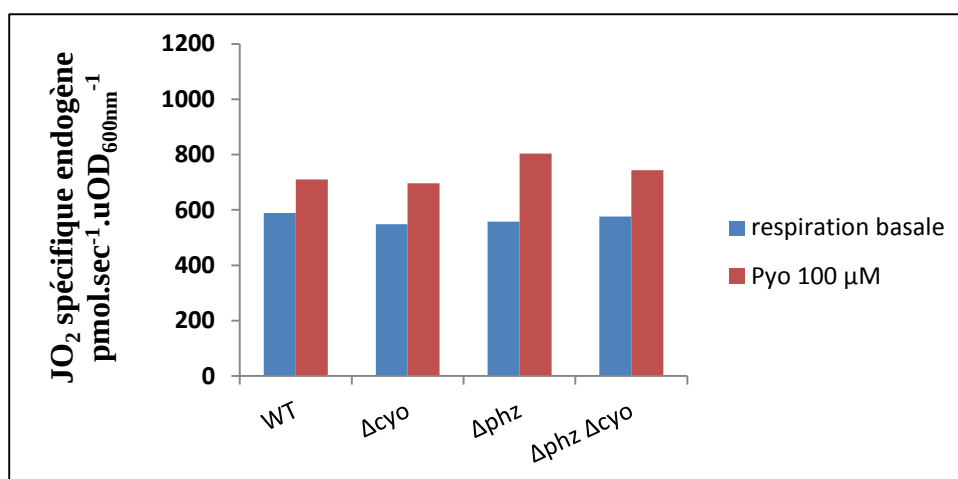


Figure 77: JO₂ spécifique endogène des souches WT, Δphz, Δcyo et Δphz Δcyo cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout de PYO 100 μM. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

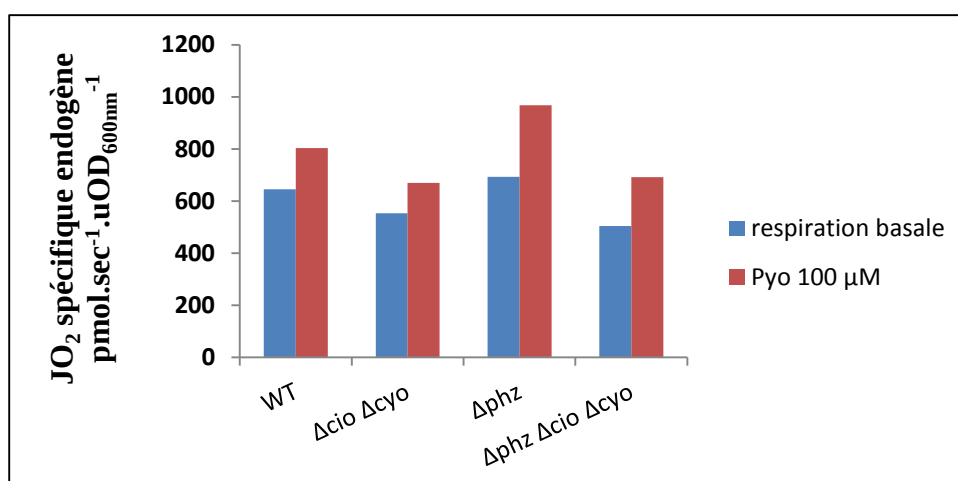


Figure 78: JO₂ spécifique endogène des souches WT, Δphz, Δcio Δcyo et Δphz Δcio Δcyo cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout de PYO 100μM. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

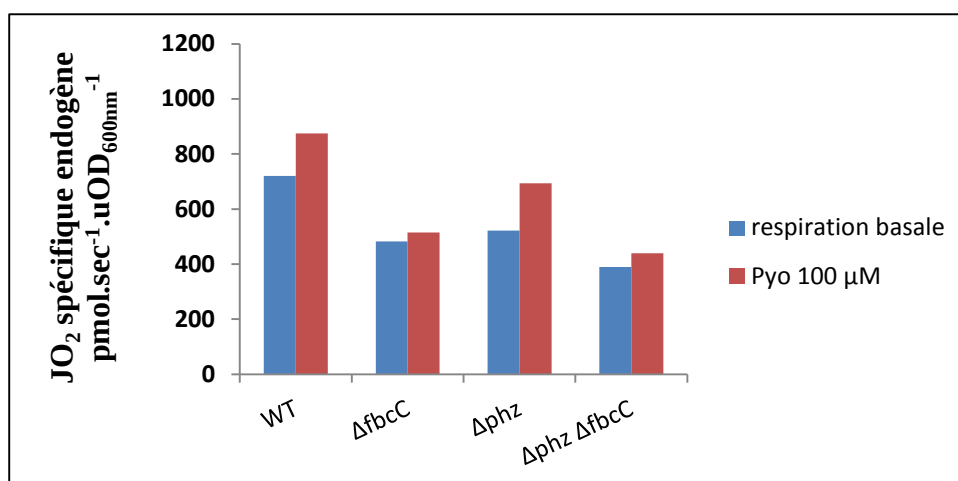


Figure 79: JO₂ spécifique endogène des souches WT, Δphz, ΔfbcC et Δphz ΔfbcC cultivées sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout de PYO 100 μM. (Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 déterminations).

D. Effet de poisons respiratoires

Peu de données sont disponibles dans la bibliographie en ce qui concerne l'effet de différents poisons respiratoires sur la respiration de *Pa*. De plus, l'ensemble de données obtenues jusqu'à présent dans notre étude, ont permis de suggérer l'implication du complexe III dans le recyclage redox de la PYO chez PA14.

a. Effet de poisons autres que le cyanure

Dans un premier temps, nous avons donc testé l'effet d'un panel de poisons sur la respiration de PA14 en absence de la PYO. Nous avons porté une attention particulière à différents inhibiteurs du complexe III.

Les poisons utilisés ont été les suivants :

- Roténone : inhibiteur spécifique du complexe I (Darrouzet et al., 1998)
- Piericidine A : inhibiteur du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) (Darrouzet et al., 1998).

TTFA	:	Inhibiteur de la succinate déshydrogénase et d'autres déshydrogénases ou réductases et également un agent chélateur des métaux lourds (Gutman et Hartstein, 1977; Byun et al., 2008)
Antimycine A	:	inhibiteur spécifique du complexe III (site Q _i) (Huang et al., 2005; Lai et al., 2005)
Myxothiazol	:	inhibiteur spécifique du complexe III (site Q ₀) (West et al., 1988; Young et al., 2002)
Ascochlorine	:	inhibiteur spécifique du complexe III (sites Q _i et Q ₀) (Berry et al. 2010)
Atovaquone	:	inhibiteur spécifique du complexe III (Murphy et Lang-Unnasch, 1999).
HQNO	:	Analogue des quinones, inhibiteur du complexe III (site Q _i) mais aussi de certaines quinol oxydases (Van Ark et Berden, 1977; Rich et al., 1990).

L'effet de différents poisons a été testé sur la respiration endogène des cellules lavées de PA14 WT et Δ phz, cultivées en aérobie sur milieu MOPS-succinate (40 mM).

Comme le montre le **tableau 13**, *Pa* résiste de façon remarquable à tous les poisons respiratoires mentionnés ci-dessus. La respiration de PA14 est par exemple insensible à l'antimycine A ou au myxothiazol (10 μ M). Ce résultat est en accord avec les travaux d'Armitage et Evans (1983) qui ont montré que *Pa* résiste à l'antimycine A et à d'autres poisons respiratoires. En effet, *Pa* est naturellement résistante à un certain nombre des drogues, de par la faible perméabilité de son enveloppe cellulaire mais également par la présence de nombreuses pompes d'efflux (Poole, 2001; Schweizer, H. P. 2003). Même en doublant la quantité de poisons (20 μ M d'antimycine A, 20 μ M de myxothiazol), nous n'avons observé aucun effet significatif sur la consommation d'O₂ par PA14 (**données non montrées**).

Parallèlement, l'efficacité de certains poisons respiratoires a été vérifiée en utilisant la levure *S. cerevisiae* cultivée en aérobiose sur YPD. Comme attendu, le **tableau 13** montre

que l'antimycine A, le myxothiazol, le HQNO et l'ascochlorine inhibent fortement la respiration des souches WT-BY et W303. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Thierbach et Reichenbach (1981) qui ont montré que *S. cerevisiae* est sensible au myxothiazol et à l'antimycine A.

Tableau 13: Effet de poisons respiratoires sur le flux spécifique de consommation d'O₂ chez PA14 (WT et Δ phz1/2) et chez *S. cerevisiae* (WT-BY et W303).

Poison et concentration testée	% d'inhibition chez :			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	PA14WT	PA14 Δ phz	WT-BY	W303
Roténone (10 μ M)	1 %	0 %	Nd	Nd
Piericidin A (30 μ M)	4 %	5 %	Nd	Nd
TTFA (250 μ M)	3 %	Nd	Nd	Nd
Antimycine A (10 μ M)	4 %	2,5 %	84 %	89 %
Myxothiazol (10 μ M)	5 %	5 %	82 %	88 %
Ascochlorin (10 μ M)	10 %	7 %	82 %	89 %
Atovaquone (5 μ M)	0 %	Nd	Nd	Nd
HQNO (38 μ M)	0 %	0 %	Nd	82 %

Nd : non déterminé.

b. Effet du cyanure

Nous avons montré dans le chapitre précédent que le cyanure (1 mM) inhibe fortement la respiration de certaines bactéries (*E. coli*, *S. aureus* et *M. luteus*), et que l'ajout de PYO (100 μ M) après le KCN permet une forte reprise de la consommation de l'O₂. Afin de tester si le même phénomène est observé avec PA14, nous avons mesuré le flux spécifique de consommation de l'O₂ des cellules lavées de PA14 Δ phz, lors de l'ajout successif de :

KCN 1mM puis PYO 100 μ M ou PYO100 μ M puis KCN 1 mM

La **figure 80** montre que le KCN (1 mM) inhibe lentement la respiration endogène de PA14 et que l'inhibition n'est pas totale. L'ajout de PYO (100 μ M) après le KCN n'a pas ou peu d'effet sur la consommation d'O₂ de PA14 Δ phz. *Pa* se distingue donc nettement des autres bactéries en terme réponse à l'ajout de PYO en présence de KCN.

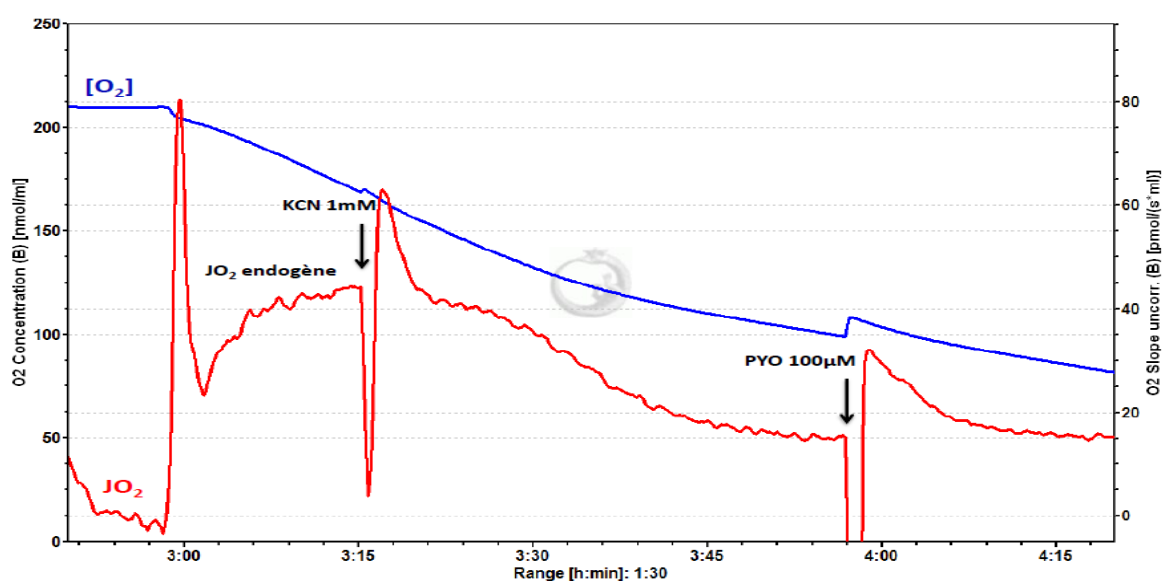


Figure 80 : Suivi du flux endogène de consommation d'O₂ chez la souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS-succinate (40 mM) après l'ajout successif de KCN 1 mM puis de PYO 100 μ M. La concentration en O₂ est en bleu et la vitesse de consommation d'O₂ est en rouge.

Ces données suggèrent d'une part, que les oxydases terminales *cbb*₃-2 et *aa*₃ (sensibles au cyanure) et dépendantes du complexe III peuvent être impliquées dans la réduction de la PYO chez PA14 et d'autre part que l'oxydase *cioAB* n'est pas impliquée. Des données moléculaires corroborent cette hypothèse. En effet, l'oxydase *aa*₃ est induite en phase stationnaire de croissance (Schuster et al., 2004) et l'oxydase *cbb*₃-2 est induite lors d'une limitation en oxygène (Comolli et Donohue, 2004; Alvarez-Ortega et Harwood, 2007), c'est-à-dire dans des conditions où la PYO peut être produite par *Pa*.

De plus, l'ajout de PYO (100 μ M) stimule la respiration endogène de Δ phz et l'ajout de KCN après la PYO inhibe rapidement la respiration (**données non montrées**). Ces

résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une réduction de la PYO au niveau des oxydases terminales *cbb₃-2* et *aa₃*.

c. Utilisation des cellules perméabilisées

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que *Pa* résiste à un panel important de poisons respiratoires, probablement grâce à ses pompes d'efflux. Pour palier à cette contrainte expérimentale, nous avons tout d'abord envisagé l'utilisation de sphéroplastes. Le protocole dont nous disposions mentionnait l'utilisation de lysozyme pour dégrader la paroi de *Pa* or cette digestion est relativement lente. Un temps de préparation important va de pair avec une variation potentielle de l'état physiologique des cellules et notamment de leur contenu en NADH. Cette méthode a donc été abandonnée.

Nous avons donc utilisé des cellules perméabilisées au toluène comme décrit dans Matériel et Méthodes (§.5). L'effet de la PYO sur la respiration a été systématiquement testé en présence ou non de poisons respiratoires.

Dans une première série d'expériences (**données non montrées**), des cellules de PA14 Δ phz cultivées sur milieu MOPS-succinate ont été perméabilisées. Nous avons logiquement observé que les cellules perméabilisées ont une respiration endogène très faible. En effet, les cellules perméabilisées sont vidées d'une grande partie de leur contenu cellulaire. L'ajout de succinate en excès (5-10 mM) stimule fortement leur respiration. La vitesse de consommation d'O₂ diminue cependant au cours du temps et aucun état stationnaire n'a pas pu être détecté. Dans ces conditions l'ajout de PYO n'a pas d'effet significatif sur le flux de consommation d'O₂. Le même phénomène a été observé pour des concentrations plus faibles de succinate (1 mM).

La diminution progressive du flux d'O₂ en présence de succinate pourrait être expliquée par l'hypothèse suivante : l'oxydation du succinate *via* la succinate déshydrogénase (SDH) et l'absence d'un cycle de Krebs fonctionnel dans les cellules perméabilisées conduirait à l'accumulation de fumarate et à l'inhibition progressive de la SDH.

Toujours dans ces conditions, nous avons observé que l'ajout des inhibiteurs du complexe III, antimycine A (10 μ M), ou myxothiazol (10 μ M), ou HQNO (38 μ M) inhibe la respiration des cellules perméabilisées d'environ 65%, 70% et 50% respectivement. Ce résultat suggère que la résistance naturelle de *Pa* aux poisons respiratoires serait due à la forte activité des pompes d'efflux. Suite à l'ajout des inhibiteurs, des états stationnaires de respiration ont pu être atteints. Dans ce cas l'ajout de PYO n'a aucun effet sur le flux de consommation d' O_2 . Ce résultat est en accord avec les hypothèses formulées précédemment : la réduction complexe III-dépendante de la PYO chez PA14 et/ou la réduction directe de la PYO par le NADH. Les cellules perméabilisées sont vidées d'une grande partie de leur contenu cellulaire y compris le NADH.

Un deuxième type de cellules perméabilisées a ensuite été testé. Nous avons perméabilisé des cellules cultivées sur D-L lactate comme source de carbone et d'énergie.

Le lactate 5 mM stimule la respiration de ces cellules perméabilisées (**Figure 81**). Malheureusement, là encore, nous avons observé une décroissance progressive de la respiration (en raison peut-être de l'accumulation de pyruvate) et aucun état stationnaire n'a pas pu être atteint. Ceci a compliqué notre approche expérimentale. Dans ces conditions, l'ajout de PYO stimule légèrement la respiration.

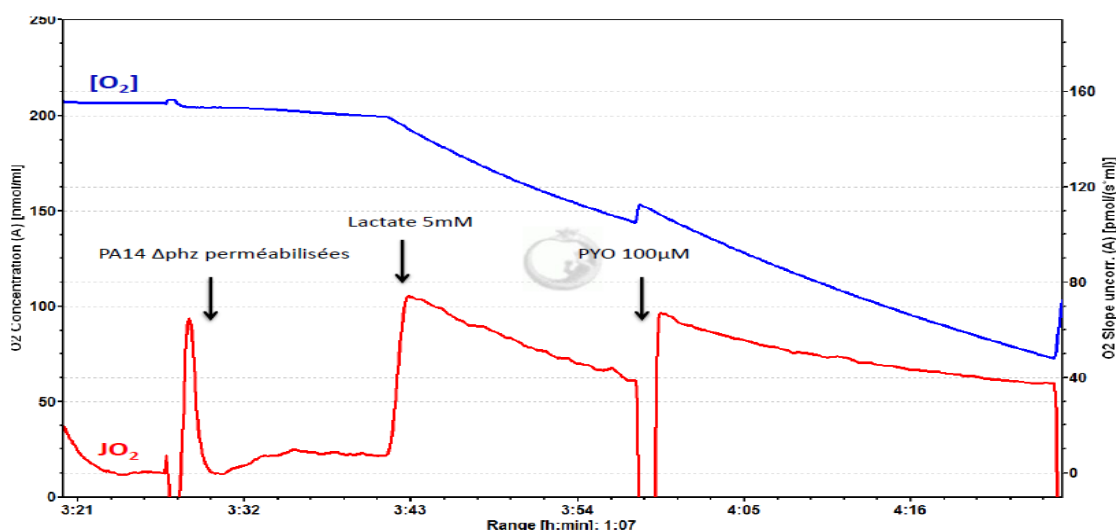


Figure 81: Suivi de JO_2 de cellules perméabilisées, souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS-D-L lactate (40 mM) après l'ajout successif de D-L lactate 5 mM puis de PYO 100 μ M. La concentration en O_2 est en bleu et la vitesse de consommation d' O_2 est en rouge.

Comme observé pour les cellules cultivées sur succinate (**données non montrées**), l'ajout de l'antimycine A (10 μ M), ou de myxothiazol (10 μ M) inhibe partiellement la respiration sur lactate (**Figure 82**). De plus, l'ajout de PYO stimule la consommation d' O_2 en présence de l'antimycine A. ces résultats suggèrent que la PYO peut stimuler la consommation d' O_2 d'une manière indépendante du complexe III.

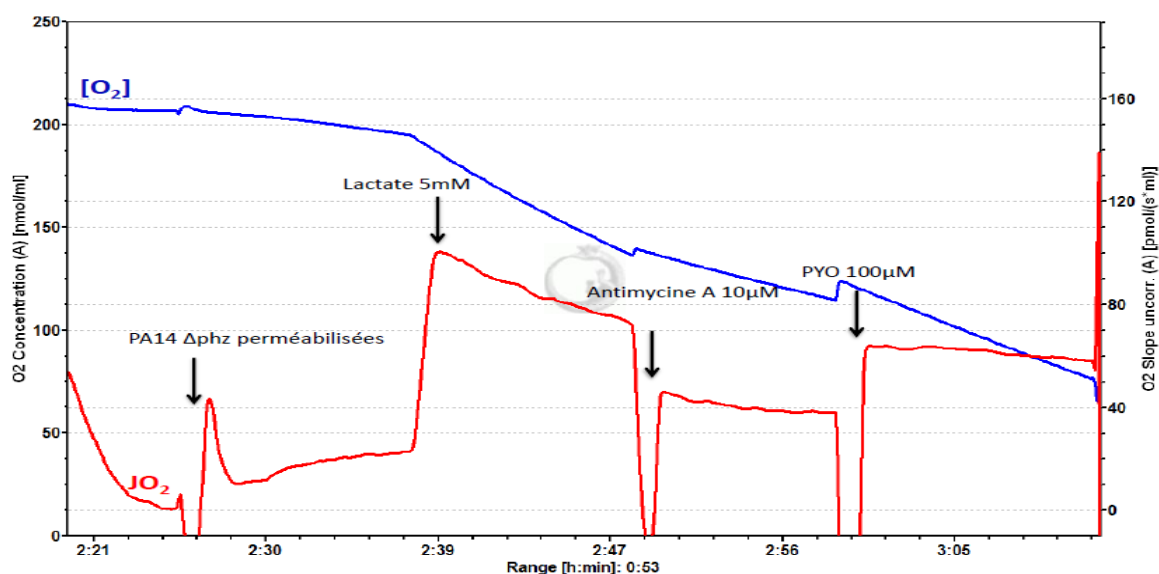


Figure 82: Suivi de JO_2 des cellules perméabilisées, souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS-D-L lactate (40 mM) après l'ajout successif de D-L lactate 5 mM, d'antimycine 10 μ M puis de PYO 100 μ M. La concentration en O_2 est en bleue et la vitesse de consommation d' O_2 est en rouge.

De même, l'ajout de KCN (1mM) inhibe la respiration des cellules perméabilisées, et de façon surprenante l'ajout de PYO après le KCN permet une reprise de la consommation d' O_2 (**Figure 83**).

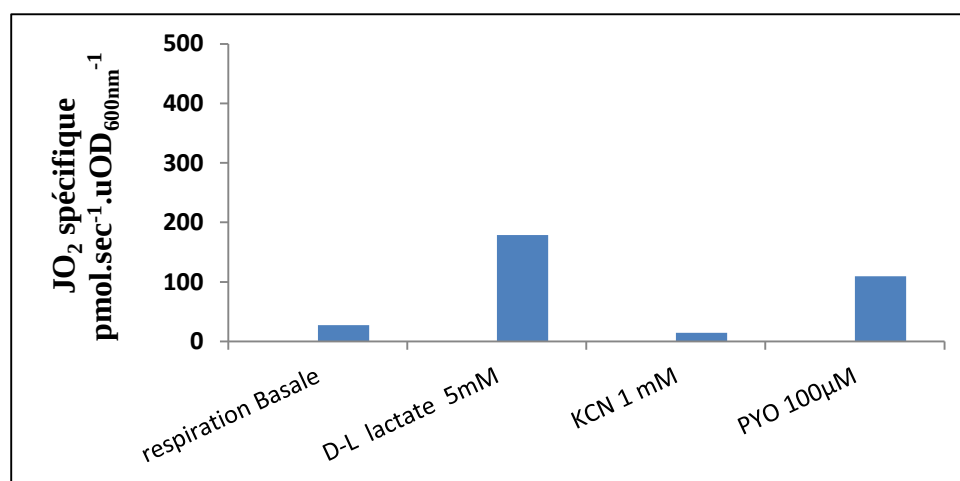


Figure 83: JO₂ spécifique des cellules perméabilisées souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS- D-L lactate (40 mM) : respiration basale, et après l'ajout successif de D-L lactate (5 mM), KCN (1 mM) et PYO (100 μ M).

Chez les « resting cells » perméabilisées cultivées sur lactate, la PYO permet donc de stimuler la consommation d'O₂ en présence d'inhibiteurs du complexe III et de KCN. Ces résultats pourraient être expliqués par l'implication directe de la lactate déshydrogénase dans la réduction de la PYO chez PA14. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Kurachi (1960) qui a suggéré que le lactate peut réduire la PYO *via* la lactate déshydrogénase.

5. Effet de la PYO sur la respiration de PA14 sous différentes tensions d'O₂.

Des nombreuses études suggèrent que *Pa* préfère les conditions micro-aérobies pour la production de certains facteurs de virulence (Sabra et al., 2002). De plus, la PYO est produite par *Pa* en hypoxie (Korth, 1971).

Aucune étude n'a cependant examiné l'effet de la PYO sur la respiration de *Pa* cultivée en hypoxie et lors de transitions anaérobie/aérobie. Dans ce contexte, nous avons examiné l'effet direct de la PYO sur la respiration endogène de PA14 Δ phz cultivée en normoxie, en hypoxie et en anaérobie.

Le **tableau 14** montre que la respiration endogène basale de Δphz est plus importante en normoxie qu'en hypoxie et en anaérobie.

L'effet de la PYO (100 μM) sur le flux spécifique de consommation de l' O_2 par PA14 est cependant plus important en hypoxie et en hypoxie sévère qu'en normoxie. Ces résultats suggèrent que la PYO pourrait jouer un rôle physiologique chez *Pa* surtout lorsque les accepteurs d'électrons appropriés sont peu disponibles. Cette hypothèse a déjà été formulée par Price-Whelan et al. (2007); Wang et al. (2010) puis Koley et al. (2011) pour expliquer les rôles physiologiques bénéfiques de la PYO pour son producteur *Pa*.

Tableau 14: Effet de la PYO sur la respiration endogène de PA14 Δphz , sous différentes conditions de culture (normoxie, hypoxie et anaérobie).

Conditions de culture	JO ₂ spécifique ($\text{pmol} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{uOD}_{600\text{nm}}^{-1}$)	% de stimulation par la PYO (100 μM)
Normoxie	1087	15%
Hypoxie (jarre d'anaérobie (2L) + 1 sachet générateur d'hypoxie (CAMPYGEN TM , Oxoid)	540	30%
Hypoxie sévère (jarre d'anaérobie (2L) + 2 sachets générateurs d'hypoxie (CAMPYGEN TM , Oxoid)	442	32%
Anaérobie (jarre d'anaérobie (2L) + 1 sachet générateur d'anaérobiose (AnaeroGen TM , Oxoid)	465	20%

6. Affinité de PA14 pour l' O_2

Les cellules de PA14 ont une forte capacité de consommation d' O_2 . Grâce à l'oxygraphe haute résolution, nous avons constaté que les cellules ont également une très forte affinité apparente pour l' O_2 . Un $Km_{O_2}^{app}$ de 0,11 μM a été mesuré pour les cellules de

PA14 Δ phz dans une étude préliminaire. Cette valeur ne serait pas ou peu modifiée en présence de PYO. Cette forte affinité est par exemple illustrée **figure 84** : les flux d'O₂ mesurés en présence de PYO (tracé rouge) restent élevés et peuvent même s'accélérer à des concentrations en O₂ quasi nulles (tracé bleu).

Ces données préliminaires rejoignent les travaux d'Alvarez-Ortega et Harwood (2007) qui ont suggéré que *Pa* possède une très forte affinité pour l'O₂. *Pa* pourrait par exemple proliférer par pure respiration aérobie à des concentrations en O₂ inférieures à 3 μ M. Outre les nombreuses « armes » développées par *Pa*, une très forte affinité pour l'O₂ conférerait à la bactérie un avantage sélectif supplémentaire dans le contexte infectieux (ex : poumons des malades atteints de mucoviscidose).

Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu réaliser une étude approfondie sur l'affinité apparente de *Pa* pour l'O₂ en présence et en absence de PYO.

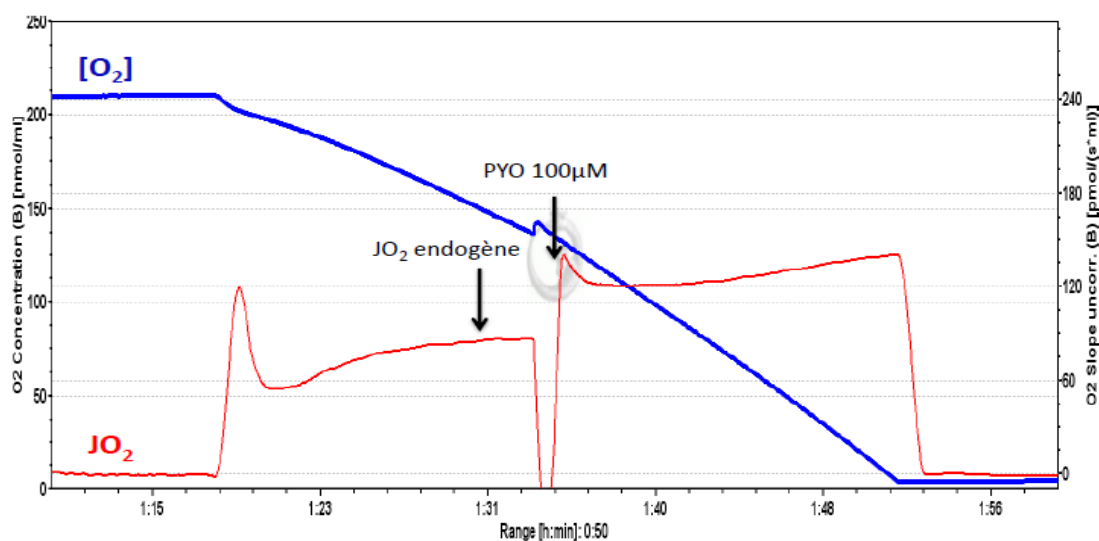
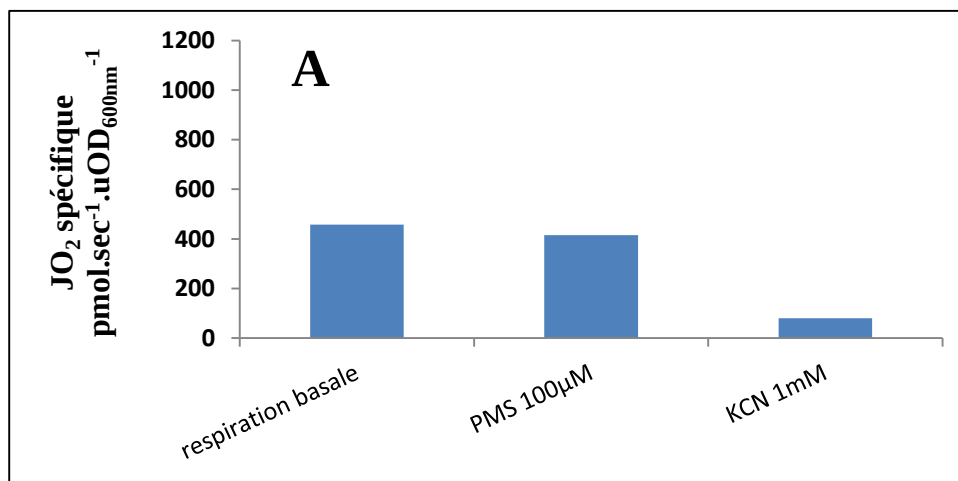


Figure 84: JO₂ endogène chez la souche PA14 Δ phZ (cultivée sur milieu MOPS additionné de succinate 40 mM) avant et après l'ajout de PYO 100 μ M. La concentration en O₂ est en bleu et la vitesse de consommation d'O₂ est en rouge.

7. Effet de la phénazine méthosulfate (PMS) sur la respiration de PA14

Afin de comparer l'effet de la PYO sur la respiration endogène de PA14 avec une autre phénazine de structure proche, nous avons testé l'effet de la phénazine méthosulfate (PMS) sur la respiration des cellules lavées de PA14 Δ phz. Le PMS est un accepteur artificiel d'électrons bien connu et par exemple utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase (SDH) (Nachlas et al., 1960).

Les résultats obtenus montrent que le PMS (100 μ M) n'a pas d'effet significatif sur la respiration endogène de PA14 (**Figure 85-A**). L'ajout de PMS (100 μ M) après le KCN n'a pas d'effet significatif sur le flux endogène de consommation de l' O_2 par PA14 (**Figure 85-B**). Ces résultats laissent supposer que la stimulation de la consommation de l' O_2 chez *Pa* n'est possible qu'avec une phénazine spécifique, la PYO. Cette observation conforte aussi l'idée de sites de réduction spécifiques à la PYO dans les cellules de *Pa*.



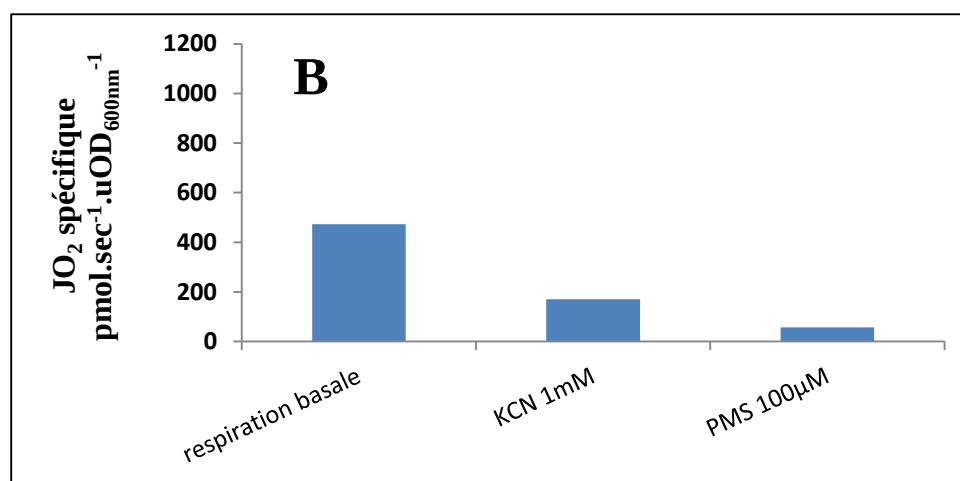


Figure 85 : JO₂ spécifique endogène de souche PA14 Δ phz, cultivée sur milieu MOPS-succinate (40 mM) : respiration basale et après l'ajout successif (A) de PMS (100 μ M) puis du KCN (1mM) (B) du KCN (1 mM) puis de PMS 100 μ M.

8. Conclusion sur les effets de la PYO sur la respiration de PA14

Le recyclage redox de la PYO et ses effets bénéfiques sur la physiologie de *Pa* sont encore mal compris. Ce questionnement a déjà fait l'objet de plusieurs études au sein de l'équipe de Dianne Newman (CalTech, USA). Nous avons donc collaboré avec cette équipe notamment pour la construction de mutants respiratoires. Les conditions de culture de PA14 ont été normalisées entre nos deux équipes. Alors que l'équipe de Dianne Newman s'est focalisée sur la mesure du taux de la réduction de la PYO (en anaérobiose), nous avons pour notre part examiné son effet sur la consommation d'O₂.

A ce jour, nous avons montré que :

- (i) la PYO stimule la consommation d'O₂ par *Pa* uniquement lorsque le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire est ralenti (« phase stationnaire, respiration endogène »)
- (ii) l'effet de la PYO sur la respiration endogène est plus important chez le mutant Δ phz
- (iii) les oxydases terminales cyoABCD et cioAB ne sont pas impliquées dans la réduction de la PYO, mais le complexe III de la chaîne respiratoire de PA14 semble requis dans certaines

conditions. Ces observations rejoignent des hypothèses formulées récemment dans la littérature.

(iv) la PYO peut stimuler la respiration de *Pa* de manière indépendante du complexe III *via* l'activité de la lactate déshydrogénase.

(v) *Pa* possède une très forte affinité pour l'O₂ en présence ou non de PYO

(vi) *via* l'activité des pompes d'efflux, *Pa* résiste à un panel très important de poisons respiratoires

Enfin, nous avons montré que l'effet de la PYO est beaucoup plus important lorsque *Pa* est cultivé en hypoxie.

L'ensemble de ces données confirment que *Pa* est particulièrement bien armée pour faire face aux conditions d'hypoxie sévère rencontrée dans le contexte infectieux (ex : mucoviscidose). Chez *Pa*, la PYO pourrait servir d'accepteur terminal alterne en conditions de détresse respiratoire généralisée, accélérant au passage la consommation des traces d'O₂ disponibles. A l'inverse, chez les cellules compétitrices (bactéries, cellules pulmonaires...), potentiellement déjà empoisonnées par le cyanure et le HQNO, la PYO exercerait sa toxicité micro-aérobie voire anaérobie.

Conclusion et Perspectives

Ce travail de thèse a eu pour objectif principal de préciser les propriétés biologiques de la pyocyanine (PYO). La PYO est le principal pigment phénazinique produit par *P. aeruginosa*. Elle joue un rôle crucial dans la virulence de *Pa* notamment en inhibant le « respiratory burst » des cellules phagocytaires et en induisant l'apoptose des cellules hôtes. Bien que la toxicité aérobie de la PYO envers les cellules de mammifères (cellules épithéliales de poumon, neutrophiles...), les levures (en particulier *Candida albicans*) et les bactéries compétitrices ait fait l'objet de nombreuses études, le(s) mécanisme(s) d'action de la PYO restent obscurs.

Afin de mieux cerner les propriétés de la PYO, une originalité de notre travail a consisté à examiner conjointement les effets de la PYO sur un modèle cellulaire eucaryote (*S. cerevisiae*) et sur un panel important de bactéries dont *Pa*. De plus, dans la grande majorité des études antérieures, la PYO était purifiée par les auteurs à partir de surnageant de culture de *Pa*. Afin de s'affranchir des biais possibles lors des étapes de purification, nous avons utilisé de la PYO purifiée commerciale Bertin Pharma®. Ce fournisseur a été choisi car nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité avec la PYO de Sigma Aldrich (données non montrées).

La toxicité de la PYO est généralement associée à l'induction d'un stress oxydatif. Cependant, ce paradigme pourrait être à nuancer en raison de la difficulté de détection des ROS en général et en présence de PYO en particulier. Dans ce travail, nous avons confirmé qu'il était impossible d'utiliser certaines sondes fluorescentes (H₂DCFDA, DHR 123) pour la détection de ROS en présence de PYO. Nous avons donc opté pour des stratégies alternatives, et notamment l'utilisation de mutants, pour mettre en évidence d'éventuels phénomènes oxydatifs.

Enfin, l'analyse de la littérature montre que la toxicité de la PYO a principalement été étudiée en aérobie, en particulier dans le cas de cellules eucaryotes. Or, ces conditions ne reflètent pas les conditions physiopathologiques. En effet, *Pa* et les cellules cibles sont confrontées à de très fortes limitations en O₂ dans le contexte infectieux (ex : poumons de malades atteints de mucoviscidose). Une autre originalité de notre travail a donc consisté à étudier la toxicité de la PYO à différentes tensions en O₂ et différents niveaux de compétence

respiratoire. En hypoxie, la PYO pourrait en outre présenter de multiples avantages pour son propre producteur *Pa* et notamment servir de navette pour le transport d'électrons. Son effet sur la respiration micro-aérobie de *Pa* n'avait pas été étudié avant ce travail de thèse.

Toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae*

Dans un premier volet, nous avons réexaminé la toxicité aérobie de la PYO vis-à-vis de la levure *S. cerevisiae*. Nous avons remis en cause en partie les études antérieures réalisées sur la levure (Ran et al., 2003 ; Angell et al., 2006) car ces auteurs avaient utilisé exclusivement des souches BY affectées partiellement dans la respiration. Comme déjà observé par ces auteurs et aussi par Kerr et al. (1999) chez *C. albicans*, *S. cerevisiae* présente en aérobiose une résistance relativement importante à la PYO. La croissance des souches sauvages n'est que partiellement inhibée à une concentration de PYO de 500 μ M. Nous avons montré que les pompes d'efflux sont impliquées dans cette résistance relative. L'imperméabilité à la PYO de la paroi cellulaire pourrait aussi jouer un rôle. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant l'effet de la PYO (+/- KCN) sur la consommation d'O₂ de sphéroplastes et/ou de cellules perméabilisées à la nystatine.

Les différentes expériences menées en aérobiose suggèrent que la toxicité de la PYO envers *S. cerevisiae* serait multifactorielle. La toxicité serait en partie liée à la réduction de la PYO par le NADPH et à la production d'anion superoxyde O₂⁻ et dans une moindre mesure de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Nous n'avons pas pu quantifier à ce jour la production de ROS en présence de PYO. Deux stratégies pourraient être utilisées pour y parvenir. La première consisterait à utiliser d'autres sondes fluorescentes en espérant qu'il n'y ait pas d'interaction avec la PYO. Le Dihydroéthidium (DHE) et l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) pourraient être testés pour la détection de l'O₂⁻ et de l'H₂O₂ respectivement. Muller (2006) a d'ailleurs utilisé l'Amplex Red pour quantifier l'H₂O₂ produit consécutivement à l'ajout de PYO dans les cellules épithéliales de poumon (A549). L'approche alternative consisterait à utiliser la résonance paramagnétique électronique RPE pour détecter les ROS. Il serait ainsi possible de mettre en évidence le type de radicaux formés et potentiellement d'évaluer leur niveau de production.

Parallèlement, nous avons montré que la N-acétyl L-cystéine (NAC, précurseur du glutathion) protège *S. cerevisiae* de la toxicité relative de la PYO en aérobiose. Ceci renforce l'hypothèse d'une implication au moins partielle du stress oxydatif dans la toxicité de la PYO. Gloyne et al. (2011) ont aussi observé cet effet sur des cellules épithéliales de poumon. La NAC, déjà connue pour son action mucolytique, permettrait ainsi d'atténuer le déséquilibre redox et l'inflammation pulmonaires (Tirouvanziam, et al. 2006) . A l'inverse, certains antioxydants tel l'acide ascorbique pourraient aggraver les effets de la PYO (données non montrées). Reszka et al. (2004) ont suggérée que le L-ascorbate peut réagir avec la PYO et favorise ainsi la production de ROS. Certains antioxydants pourraient donc s'avérer délétères dans un contexte infectieux.

L'analyse des effets de la PYO sur la croissance des souches sauvages et de mutants de *S. cerevisiae* a mis en évidence un lien assez fort entre la compétence respiratoire et la toxicité aérobie de la PYO. Cependant, les mesures d'oxygraphie haute résolution ont montré que la PYO n'a pas d'effet apparent à court terme sur la respiration de ces cellules. De même, la respiration mitochondriale à l'état 3 (excès d'ADP) ou à l'état 4 (excès d'ATP) n'est pas ou peu affectée par la PYO. La PYO ne joue donc pas le rôle d'un poison respiratoire simple. Cependant, nous ne pouvons exclure l'hypothèse d'un recyclage redox de la PYO au niveau de la chaîne respiratoire, sans effet apparent sur les flux d'O₂. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré qu'en présence de cyanure et/ou de HQNO, la PYO peut interagir avec la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* au niveau du complexe III. La PYO pourrait de ce fait inhiber les processus énergétiques et/ou générer un stress oxydatif. Nous examinerons donc à l'avenir l'effet de la PYO sur la production d'ATP sur mitochondries isolées. De nombreux protocoles de dosage de l'ATP mitochondrial sont à disposition. Afin de mieux cerner le lien existant entre respiration et toxicité de la PYO, il nous faudra également tester l'effet de la PYO sur la respiration cellulaire à long terme. Une méthode simple consistera à mesurer et à caractériser la respiration des cellules issues de cultures sur YEPGly empoisonnées par la PYO.

Une partie importante de notre étude a eu pour but de caractériser les effets de la PYO en anaérobiose. Nous avons montré sans ambiguïté que la PYO présente une toxicité plus importante en anaérobiose chez la levure *S. cerevisiae*. Ce résultat surprenant va à

l'encontre de ce qui avait été jusqu'ici observé sur des cellules procaryotes, seules cellules pour lesquelles existaient des études en anaérobiose. Les résultats obtenus avec les mutants affectés dans la résistance au stress oxydatif ont conforté l'idée que la toxicité anaérobie de la PYO n'est pas liée à une production précoce de ROS. De plus, la PYO ne semble pas perturber l'équilibre redox chez *S. cerevisiae* en anaérobiose.

La formation de PYO radical probablement fortement toxique pour des cellules non préparées à une exposition radicalaire pourrait expliquer nos résultats. Cette partie du travail fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de Dianne Newman (USA). Les mises au point pour la détection de radicaux en anaérobiose par RPE sont actuellement en cours. Si le même effet ou mécanisme opérait dans les cellules hôtes de mammifères, il pourrait remettre en cause en partie le paradigme liant la toxicité de la PYO au seul stress oxydatif aérobie (dépendant ou non de la chaîne respiratoire). La PYO pourrait être considérée comme un « poison hypoxique » par excellence, pouvant affecter les cellules eucaryotes hôtes lorsque les poisons respiratoires également produits par *Pa* (cyanure, HQNO) ne sont plus efficaces.

La levure *S. cerevisiae* est certes un modèle eucaryote mais reste un modèle très éloigné des cellules de mammifères, telles les cellules pulmonaires. Une approche expérimentale est actuellement à l'étude pour déterminer de façon rigoureuse les effets de la PYO (+/- KCN, HQNO) sur des lignées de cellules pulmonaires en aérobie et hypoxie.

L'activité antibactérienne de la PYO

Bien qu'admises, les propriétés antimicrobiennes de la PYO n'étaient pas clairement définies dans la littérature. Nous avons réexaminé ces propriétés en utilisant un large panel de bactéries, des mesures simples de croissance et aussi des mesures haute résolution de respiration.

Nous avons constaté que la PYO possède en aérobie une activité antibactérienne puissante et à large spectre contre les bactéries Gram +/- . Comme déjà décrit, les bactéries Gram + apparaissent globalement plus sensibles que les Gram -. Contrairement aux données de la littérature, attribuant au genre *Pseudomonas* une résistance à la PYO, nous avons montré la sensibilité de souches de *Pseudomonas* à la PYO dans certaines conditions (milieu

riche et aérobie). En réalité, seule la souche productrice *Pa* résiste à la PYO. Aucune relation simple n'a été trouvée entre la résistance à la PYO et le caractère oxydase +/- ou les voies de dégradation des sucres.

Contrairement à la levure *S. cerevisiae*, les bactéries sont plus sensibles à la PYO en aérobie. Les effets de la PYO varient donc fortement selon le type de microorganismes. Chez plusieurs bactéries, la toxicité de la PYO est accrue en croissance respiratoire aérobie ou anaérobie.

Dans ce contexte, nous avons étudié les effets de la PYO sur la respiration de trois bactéries sensibles, *E. coli*, *S. aureus* et *M. luteus*. Comme chez la levure, la PYO n'a pas d'effet apparent à court terme sur la respiration des bactéries en croissance. Elle ne se comporte pas comme un poison respiratoire simple. Cependant, nous avons montré que la PYO stimule la consommation d'O₂ des bactéries empoisonnées au cyanure (1 mM). Cet effet ressemble à celui observé sur les mitochondries de levures. La PYO pourrait donc être réduite par le NAD(P)H cytosolique et/ou elle pourrait interagir avec la chaîne respiratoire et induire un stress oxydatif dans les deux cas. Ces mécanismes n'ont pas pu être clarifiés. Néanmoins, dans le contexte infectieux pulmonaire (mucoviscidose), cette forme de consommation d'O₂ induite par la PYO et le cyanure pourrait contribuer à limiter la disponibilité en O₂ dans les tissus pulmonaires co-infectés par *Pa* et d'autres espèces microbiennes.

Les données respirométriques les plus probantes ont été obtenues en utilisant de cellules lavées de *S. aureus*. Chez cette bactérie possédant un complexe III contrairement à *E. coli*, la PYO oxydée semble pouvoir jouer le rôle de véritable poison respiratoire, avec une action ciblée sur le complexe III. Ces données rejoignent les hypothèses formulées par Voggu et al (2006) ; ces auteurs ont supposé que la PYO est un poison ciblant la respiration des certains Staphylocoques dont *S. aureus*. La chaîne respiratoire de *S. aureus* serait en réalité sensible aux trois poisons produits par *Pa* en hypoxie. Ces données renforcent aussi l'idée de relations singulières de compétition existant entre *Pa* et *S. aureus*. La bactérie *S. aureus* est par exemple une source potentielle de fer pour *Pa* (Hibbing et al, 2010).

A ce jour, nous ne savons pas pourquoi la PYO n'inhibe pas la respiration à court terme des cellules de *S. aureus* en culture sur milieu riche. La diversité des voies de transfert

d'électrons au sein de la chaîne respiratoire branchée de *S. aureus* pourrait peut-être expliquer cette résistance apparente à la PYO. Cette problématique pourrait aussi expliquer certaines données contradictoires existant dans la littérature. Notre étude a en tout cas confirmé la nécessité de tester différentes situations physiologiques pour éviter des simplifications abusives sur les effets de la PYO.

L'étude réalisée sur les bactéries soulève plusieurs perspectives expérimentales. Citons-en deux. D'une part, l'étude menée pourrait être complétée en élargissant le panel de bactéries, en incluant par exemple d'autres souches de Staphylocoques et des souches bactériennes isolées de patients atteints de mucoviscidose. Plus important, nous devons à l'avenir caractériser les effets de la PYO sur des membranes cellulaires purifiées. Cela permettra de s'affranchir de la présence de NAD(P)H. En jouant sur les conditions de culture, il sera possible de moduler l'équipement enzymatique des chaînes respiratoires de micro-organismes modèles (ex : *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*) et ainsi de mieux comprendre les propriétés de la PYO (mécanisme unique ou multiplicité des effets). Les effets de la PYO pourront être caractérisés par des mesures oxygraphiques et des spectres de cytochromes (réduits vs oxydés) en présence ou non de poisons respiratoires (KCN, HQNO, antimycine A, myxothiazol).

Les effets de la PYO sur la respiration de *Pa*

La PYO n'affecte pas la croissance de son producteur *Pa* et des rôles bénéfiques ont même été décrits. Comment expliquer cette résistance et la PYO interagit-elle favorablement avec la respiration de *Pa* ? Dans la dernière partie du travail de thèse, nous nous sommes attachés à déterminer les effets directs de la PYO sur la respiration de la bactérie productrice PA14.

Après de nombreuses mises au point, l'utilisation de l'oxygraphe haute résolution Oroboros-O2K a permis de montrer que la PYO stimule significativement la respiration de PA14 uniquement lorsque PA14 est en phase stationnaire et lorsque le transfert des électrons à l'O₂ est réduit (cas des cellules lavées en carence carbonée). L'effet est plus important ($\approx 30\%$) pour les cellules cultivées en hypoxie. Il a été montré que la PYO est produite par *Pa* en phase stationnaire (Price-Whelan et al., 2007) et qu'elle jouerait des rôles physiologiques

chez *Pa* surtout en condition de limitation en O₂ (Xu et al., 1998; Wang et al., 2010). Nous donnés suggèrent que la PYO stimule la respiration de *Pa* dans des conditions mimant le contexte infectieux et la vie en biofilm (vie ralentie).

Il est à noter que les cellules lavées de *Pa* ne sont pas stables. L'effet positif de la PYO sur la respiration est perdu après stockage des cellules lavées à +4°C et au-delà de deux heures de conservation à température ambiante. Nous ne savons pas à ce jour comment expliquer ce phénomène qui a représenté une contrainte expérimentale importante.

Pour expliquer l'effet positif de la PYO sur la respiration de PA14, nous avons supposé dans un premier temps que le NADH est impliqué dans la réduction de la PYO. L'utilisation du mutant $\Delta phz1/2$, incapable de synthétiser des phénazines telle que la PYO, a permis de montrer un effet plus important de la PYO sur la respiration. Or, ce mutant accumule davantage de NADH en phase stationnaire (Price-Whelan et al., 2007). La PYO pourrait contribuer à oxyder les surplus de NADH en conditions de limitation en O₂ et/ou de transferts d'électrons limités au sein de la chaîne respiratoire.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'identifier des sites de recyclage redox de la PYO au niveau de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire de *Pa* est complexe et n'a été que très peu caractérisée d'un point de vue fonctionnel. De plus, la résistance remarquable de *Pa* à un panel important de poisons respiratoires a compliqué notre approche.

Cependant, les suivis de respiration et de réduction de la PYO (par l'équipe de Dianne Newman) effectués sur différents mutants de la chaîne respiratoire ont révélé que les quinol oxydases terminales *cioAB* et *cyoABCD* ne sont pas impliquées dans le recyclage redox de la PYO chez PA14. A l'inverse, les résultats obtenus (après culture sur succinate) avec le mutant $\Delta fbcC$ suggèrent une implication du complexe III. Cela a été confirmé par des mesures préliminaires de spectres oxydo-réduits de cytochromes (données non montrées). Les cytochromes de types b et c, fortement réduits par les substrats endogènes, sont normalement partiellement oxydés suite à l'ajout de PYO et à la limitation en O₂ dans les cuves de mesure. Chez le mutant $\Delta fbcC$, peu ou pas affecté dans les teneurs en cytochromes b et c, aucune oxydation de ces cytochromes n'a été détectée.

Plus précisément, le recyclage de la PYO pourrait intervenir au niveau des oxydases terminales *cbb₃-2* et/ou *aa₃* toutes deux dépendantes du complexe III et sensibles au cyanure. Or, PYO et cyanure sont co-produits en hypoxie par les cellules en phase stationnaire. Donc, dans le contexte infectieux, en présence de cyanure et/ou en l'absence d'O₂, la PYO pourrait être réduite de façon complexe-III dépendante mais sans subir d'oxydation. La résistance à HQNO, produit également par *Pa* dans ces conditions, serait conférée par les pompes d'efflux. L'ensemble de ces données rejoint les hypothèses formulées récemment sur le rôle du complexe III, de la cytochrome c oxydase *cbb3-2* et de la PYO dans la structuration en hypoxie des biofilms de *Pa* (Koley et al, 2011 ; Arai et al, 2011 ; Alvarez-Ortega & Harwood, 2007). Elles sont compatibles avec l'idée d'une « PYO electrocline » existant au sein des biofilms de *Pa* (Koley et al, 2011).

La PYO pourrait également stimuler la respiration de *Pa* indépendamment du complexe III. Cela a été montré sur des cellules lavées issues de culture sur lactate. Nous supposons que la PYO pourrait subir un recyclage redox au niveau des résidus flavines de la lactate déshydrogénase membranaire. A ce jour, cette activité enzymatique (comme beaucoup d'autres) n'a pas été caractérisée d'un point de vue fonctionnel chez *Pa*. Nous ne savons donc pas si la LDH de *Pa* donne normalement ses électrons aux quinones ou au cytochrome c. Comme évoqué précédemment, ces données montrent qu'il faut rester prudent et examiner les effets de la PYO dans différentes situations physiologiques avant de tirer des conclusions définitives.

Dans ce contexte, il sera très intéressant d'étudier les effets de la PYO sur la respiration de souches cliniques de *Pa* en utilisant un milieu de culture artificiel mimant les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Un tel milieu, désigné ASM (Artificial sputum medium), a été récemment défini et utilisé pour étudier la résistance ou la sensibilité de *Pa* aux antibiotiques (Kirchner et al., 2012). Dans ces conditions, nous envisageons d'étudier l'effet de la PYO sur les cellules planctoniques et les cellules en biofilm remises en suspension, et aussi de caractériser de façon approfondie l'affinité de *Pa* pour l'O₂ (Km O₂^{app}). Une étude sur les effets combinés de la PYO, des autres phénazines, du cyanure et HQNO pourra aussi être envisagée.

Pour notre étude, nous avons privilégié des conditions physiologiques et donc l'utilisation de cellules entières. Par manque de temps (thèse en 2 ans), l'étude sur membranes isolées (oxygraphie, spectres de cytochromes) n'a pu être effectuée à ce jour. Cette étude nous permettra de nous affranchir des phénomènes d'oxydation chimique impliquant le NADH, la PYO et l'O₂. Bien que de tels phénomènes puissent avoir lieu dans la cellule, ils n'expliquent pas l'implication du complexe III dans le recyclage redox de la PYO. Sur les membranes isolées, nous pourrions utiliser un panel de poisons respiratoires pour préciser le(s) site(s) de réduction/oxydation de la PYO au niveau de la chaîne respiratoire.

En conclusion, bien que de nombreuses questions restent en suspens, notre étude a confirmé ou mis en évidence certaines propriétés biologiques de la PYO. Outre sa propension à générer un stress oxydatif chez les cellules hôtes, la PYO serait capable d'affecter le métabolisme anaérobie eucaryote. Elle serait aussi capable de perturber la respiration (aérobie ou anaérobie) de nombreux organismes cibles, et plus particulièrement *S. aureus* (bactérie souvent isolée de crachats de malades atteints de mucoviscidose) en bloquant son complexe III. Nous pensons que la PYO est un « poison hypoxique » par excellence, capable de générer un stress oxydatif en présence ou non d'O₂ via le PYO radical et jouant parfois le rôle de véritable poison respiratoire. En présence d'autres poisons (cyanure, HQNO), la PYO aggraverait considérablement la détresse respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. D'autre part, les mécanismes de résistance de la bactérie productrice *Pa* vis-à-vis de la PYO restent mystérieux. La PYO pourrait même jouer un rôle antioxydant chez *Pa* (Vinckx et al, 2010). Nos résultats ont confirmé que la PYO a des rôles bénéfiques pour *Pa* lorsque les transferts d'électrons sont limités (limitation en O₂, vie ralentie). En présence d'O₂, la PYO pourrait participer au métabolisme énergétique, et l'existence d'une boucle redox « PYO/PYOH₂ » génératrice de force protomotrice n'est pas exclue. L'absence de toxicité voire le rôle antioxydant pourrait être expliqué par ce recyclage redox particulier chez *Pa*, conduisant à la production d'H₂O et non de ROS. En anaérobiose, la PYO participerait à la structuration spatiale des biofilms, tout en inhibant le métabolisme anaérobie de l'hôte.

Références Bibliographiques

Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S. E., Uribelarrea, J. L., Goma, G. et Benbadis, L. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **60**, 67-72.

Alvarez-Ortega, C. et Harwood, C. S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration . *Mol. Microbiol* **65**, 153-165.

Angell, S., Bench, B. J., Williams, H. et Watanabe, C. M. (2006). Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action . *Chem. Biol* **13**, 1349-1359.

Arai, H. (2011). Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* . *Front Microbiol* **2**, 103.

Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. et Kodama, T. (1990). Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa* . *FEBS Lett* **261**, 196-198.

Armitage, J. P. et Evans, M. C. (1983). The motile and tactic behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* in anaerobic environments. *FEBS Lett* **156**, 113-118.

Armstrong, A. V. et Stewart-Tull, D. E. S. (1971). The Site Of The Activity Of Extracellular Products Of *Pseudomonas Aeruginosa* In The Electron-Transport Chain In Mammalian Cell Respiration. *J Med Microbiol* **4**, 263-270.

Avéret, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M. et Guérin, B. 1998. Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* **184**, 67-79.

Baron, S. S. et Rowe, J. J. (1981). Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother* **20**, 814-820.

Baron, S. S., Terranova, G. et Rowe, J. J. (1989). Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. *Current Microbiol* **18**, 223-230.

- Beauvoit, B., Rigoulet, M., Bunoust, O., Raffard, G., Canioni, P. et Guérin, B. (1993).** Interactions between glucose metabolism and oxidative phosphorylations on respiratory-competent *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur J Biochem* **214**, 163-172.
- Berry, E. A., Huang, L. S., Lee, D. W., Daldal, F., Nagai, K. et Minagawa, N. (2010).** Ascochlorin is a novel, specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome bc1 complex . *Biochim Biophys Acta* **1797**, 360-370.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F. O., Ros, A., Lucht, F. et Pozzetto, B. (2005).** Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* . *Pathol Biol* **53**, 341-348.
- Bianconi, I., Milani, A., Cigana, C., Paroni, M., Levesque, R. C., Bertoni, G. et Bragonzi, A. (2011).** Positive Signature-Tagged Mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Tracking Patho-Adaptive Mutations Promoting Airways Chronic Infection . *PLoS Pathog* **7**, 1001270.
- Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. et Martins dos Santos, V. A. (2008).** Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* **30**, 777-790.
- Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P. et Herndon, D. N. (2009).** Emerging infections in burns. *Surg Infect* **10**, 389-397.
- Britigan, B. E., Roeder, T. L., Rasmussen, G. T., Shasby, D. M., McCormick, M. L. et Cox, C. D. (1992).** Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J Clin Invest* **90**, 2187-2196.
- Burgess, J. G., Boyd, K. G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A. et Adams, D. R. (2003).** The Development of a Marine Natural Product-based Antifouling Paint. *Biofouling* **19**, 197-205.

Burke, K. A. et Lascelles, J. (1975). Nitrate reductase system in *Staphylococcus aureus* wild type and mutants. *J Bacteriol* **123**, 308-316.

Burns, J. L., Van Dalfsen, J. M., Shawar, R. M., Otto, K. L., Garber, R. L., Quan, J. M., Montgomery, A. B., Albers, G. M., Ramsey, B. W. et Smith, A. L. (1999). Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **179**, 1190-1196.

Byun, H. O., Kim, H. Y., Lim, J. J., Seo, Y. H. et Yoon, G. (2008). Mitochondrial dysfunction by complex II inhibition delays overall cell cycle progression via reactive oxygen species production . *J Cell Biochem* **104**, 1747-1759.

Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., Young, L. R., Mavrodi, D., Thomashow, L. et Lau, G. W. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis . *Am J Pathol* **175**, 2473-2488.

Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. et Rahme, L. G. (2001). A Quorum Sensing-associated Virulence Gene of *Pseudomonas Aeruginosa* Encodes a LysR-like Transcription Regulator with a Unique Self-regulatory Mechanism. *PNAS* **98**, 14613-14618.

Carlsson, M., Shukla, S., Petersson, A. C., Segelmark, M. et Hellmark, T. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pyocyanin negative strains are associated with BPI-ANCA and progressive lung disease . *J Cyst Fibros* **10**, 265-271.

Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V. et Lugtenberg, B. J. J. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria . *New Phytologist* **157**, 503-523.

Chythanya, R., Karunasagar, I. et Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* **208**, 1-10.

- Clarkson, S. P., Large, P. J., Boulton, C. A. et Bamforth, C. W. (1991).** Synthesis of superoxide dismutase, catalase and other enzymes and oxygen and superoxide toxicity during changes in oxygen concentration in cultures of brewing yeast. *Yeast* **7**, 91–103.
- Collins, F. M. et Lascelles, J. (1962).** The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **29**, 531-535.
- Comolli, J. C. et Donohue, T. J. (2004).** Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb3 cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**, 1193-1203.
- Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. et Kim, D. S. (1995).** Molecular Mechanisms of Defense by Rhizobacteria Against Root Disease. *PNAS* **92**, 4197-4201.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. et Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Cox, C. D. (1986).** Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**, 263-270.
- D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. et Manoil, C. (2001).** *Drosophila* as a Model Host for *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *J Bacteriol* **183**, 1466-1471.
- Darrouzet, E., Issartel, J. P., Lunardi, J. et Dupuis, A. (1998).** The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett* **431**, 34-38.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. et Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- Deken, R. H. (1966).** The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol* **44**, 149-156.

de Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C. et Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS Microbiol Lett* **212**, 101-106.

Delaney, S. M., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F. et Thomashow, L. S. (2001). phzO, a Gene for Biosynthesis of 2-Hydroxylated Phenazine Compounds in *Pseudomonas Aureofaciens* 30-84. *J Bacteriol* **183**, 318-327.

Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. et Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **61**, 1308-1321.

Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S. et West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**, 411-414.

Dinkova-Kostova, A. T. et Talalay, P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic biol & Med* **29**, 231-240.

Dowling, R. B., Rayner, C. F., Rutman, A., Jackson, A. D., Kanthakumar, K., Dewar, A., Taylor, G. W., Cole, P. J., Johnson, M. et Wilson, R. (1997). Effect of salmeterol on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 327-336.

Elston, H. R. et Hoffman, K. C. (1967). Increasing incidence of encapsulated *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Am J Clin Path* **48**, 519-523.

Falk, R. J. et Jennette, J. C. (1988). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* **318**, 1651-1657.

Filloux, A. et Vallet, I. (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci* **19**, 77-83.

- Fothergill, J. L., Panagea, S., Hart, C. A., Walshaw, M. J., Pitt, T. L. et Winstanley, C. (2007).** Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiol* **7**, 45.
- Friedheim, E. A. H. (1931).** Pyocyanine, an Accessory Respiratory Enzyme. *J Exp Med* **54**, 207-221.
- Friedheim, E. et Michaelis, L. (1931).** Potentiometric Study of Pyocyanine. *J Biol Chem* **91**, 355-368.
- Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Hecker, M. et Engelmann, S. (2007).** Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 4275-4289.
- Fujita, M., Tanaka, K., Takahashi, H. et Amemura, A. (1994).** Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol Microbiol* **13**, 1071-1077.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. et Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Gaisne, M., Bécam, A. M., Verdière, J. et Herbert, C. J. (1999).** A “natural” mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene HAP1 (CYP1). *Curr Genet* **36**, 195-200.
- Gardner, P. R. (1996).** Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells. *Arch Biochem Biophys* **333**, 267-274.
- Gibson, J., Sood, A. et Hogan, D. A. (2009).** *Pseudomonas Aeruginosa*-*Candida Albicans* Interactions: Localization and Fungal Toxicity of a Phenazine Derivative. *Appl Environ. Microbiol* **75**, 504-513.

Gliszczynska-Świgło, A., van der Woude, H., de Haan, L., Tyrakowska, B., Aarts, J. et Rietjens, I. (2003). The role of quinone reductase (NQO1) and quinone chemistry in quercetin cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* **17**, 423-431.

Gloyne, L. S., Grant, G. D., Perkins, A. V., Powell, K. L., McDermott, C. M., Johnson, P. V., Anderson, G. J., Kiefel, M. et Anoopkumar-Dukie, S. (2011). Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress. *Toxicol In Vitro* **25**, 1353-1358.

Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S. et Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**, 745-754.

Govan, J. R. et Harris, G. S. (1986). *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol Sci* **3**, 302-308.

Gutman, M. et Hartstein, E. (1977). Distinction between NAD- and NADH-binding forms of mitochondrial malate dehydrogenase as shown by inhibition with thenoyltrifluoroacetone. *Biochim Biophys Acta - Enzymology* **481**, 33-41.

Hasegawa, N., Arai, H. et Igarashi, Y. (2003). Need for cytochrome bc1 complex for dissimilatory nitrite reduction of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci biotechnol biochem* **67**, 121-126.

Hassan, H. M. et Fridovich, I. (1979). Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch of Biochem and Biophys* **196**, 385-395.

Hassan, H. M. et Fridovich, I. (1980). Mechanism of the Antibiotic Action Pyocyanine. *J Bacteriol* **141**, 156-163.

Hassett, D. J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D. E. et Cohen, M. S. (1992). Response of *Pseudomonas Aeruginosa* to Pyocyanin: Mechanisms of Resistance, Antioxidant Defenses, and Demonstration of a Manganese-Cofactored Superoxide Dismutase. *Infect and Immun* **60**, 328-336.

Hawdon, N. A., Aval, P. S., Barnes, R. J., Gravelle, S. K., Rosengren, J., Khan, S., Ciofu, O., Johansen, H. K., Høiby, N. et Ulanova, M. (2010). Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 207-220.

Hernandez, M. E., Kappler, A. et Newman, D. K. (2004). Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. *Appl Environ Microbiol* **70**, 921-928.

Heurlier, K., Dénervaud, V. et Haas, D. (2006). Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**, 93-102.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. et Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**, 15-25.

Hoffman, L. R., Déziel, E., D'Argenio, D. A., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R. L., Ramsey, B. W. et Miller, S. I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **103**, 19890-19895.

Hogan, D. A. et Kolter, R. (2002). *Pseudomonas*-*Candida* Interactions: An Ecological Role for Virulence Factors. *Science* **296**, 2229-2232.

Hogardt, M. et Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**, 557-562.

Huang, L. S., Cobessi, D., Tung, E. Y. et Berry, E. A. (2005). Binding of the Respiratory Chain Inhibitor Antimycin to the Mitochondrial bc1 Complex: A New Crystal Structure Reveals an Altered Intramolecular Hydrogen-bonding Pattern. *J Mol Biol* **351**, 573-597.

Jenne, D. E., Tschopp, J., Lüdemann, J., Utecht, B. et Gross, W. L. (1990). Wegener's autoantigen decoded. *Nature* **346**, 520.

Jørgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P. et Stewart, G. S. (1999). RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* **145**, 835-844.

Juhas, M., Eberl, L. et Tümmler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ microbiol* **7**, 459-471.

Kaplan, N. O. (1985). The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr Top Cell Regul* **26**, 371-381.

Katznelson, H. (1955). The metabolism of phytopathogenic bacteria I. Comparative Studies on the Metabolism of Representative Species. *J Bacteriol* **70**, 469-475.

Kawakami, T., Kuroki, M., Ishii, M., Igarashi, Y. et Arai, H. (2010). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ microbiol* **12**, 1399-1412.

Kerr, J. R. (1994). Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **32**, 525-527.

Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J. et Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol* **52**, 385-387.

Kipnis, E., Sawa, T. et Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses* **36**, 78-91.

Kirchner, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., James, C. E., Mowat, E. et Winstanley, C. (2012). Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. *J vis Exp: JoVE* **64**, 3857.

Koley, D., Ramsey, M. M., Bard, A. J. et Whiteley, M. (2011). Discovery of a Biofilm Electrocline Using Real-Time 3D Metabolite Analysis. *PNAS* **108**, 19996-20001.

Kong, F., Young, L., Chen, Y., Ran, H., Meyers, M., Joseph, P., Cho, Y. H., Hassett, D. J. et Lau, G. W. (2006). Pseudomonas aeruginosa pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell microbiol* **8**, 1121-1133.

Korth, H. (1971). Effect of iron and oxygen on the formation of pigments in some Pseudomonas spp. *Arch Microbiol* **77**, 59-64.

Kumar, A.G., Rao, G.S. et Shivananda, P.G. (1997). Anti-Staphylococcal activity of Pseudomonas aeruginosa. *Curr Sci* **72**, 580– 582.

Kurachi, M. (1960). Studies on the biosynthesis of pyocyanine (IX). On the effect of pyocyanine on respiration of bacterial cells of Pseudomonas aeruginosa. *Bull Inst Chem. Res ,Kyoto Univ* **38**, 364.

Lai, B., Zhang, L., Dong, L. Y., Zhu, Y. H., Sun, F. Y. et Zheng, P. (2005). Inhibition of Qi site of mitochondrial complex III with antimycin A decreases persistent and transient sodium currents via reactive oxygen species and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells. *Exp Neurol* **194**, 484-494.

Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. et 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., Goumnerov, B. C., Walendziewicz, C. L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., Tompkins, R. G., Perkins, L. A. et Rahme, L. G. (2003). The Drosophila Melanogaster Toll Pathway Participates in Resistance to Infection by the Gram-Negative Human Pathogen Pseudomonas Aeruginosa. *Infect Immun* **71**, 4059-4066.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. et Kong, F. (2004 a). The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol Med* **10**, 599-606.

Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. et Mavrodi, D. (2004 b). Pseudomonas Aeruginosa Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infect Immun* **72**, 4275-4278.

Lazdunski, A. (2003). Pseudomonas aeruginosa : modèle de choix pour l'étude d'une bactérie pathogène opportuniste. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **22**, 523-526.

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F. et al. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Crit Care Med* **39**, 2113-2120.

Lenney, W. et Gilchrist, F. J. (2011). Pseudomonas aeruginosa and cyanide production. *Eur Respir j* **37**, 482-483.

Lenoir, G., Vrielynck, S., Clairicia, M., Afsa Fezaa, D., Sorin, M. et Sermet-Gaudelus, I. 2007. Infection bactérienne et mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires (RFL)* **397**, 49-57.

Lepine, F., Deziel, E., Milot, S. et Rahme, L. G. (2003). A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in Pseudomonas aeruginosa cultures. *Biochim Biophys Acta* **1622**, 36-41.

Lewenza, S., Visser, M. B. et Sokol, P. A. (2002). Interspecies communication between Burkholderia cepacia and Pseudomonas aeruginosa . *Can J Microbiol* **48**, 707-716.

Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. et Ausubel, F. M. (2006). An Ordered, Nonredundant Library of Pseudomonas Aeruginosa Strain PA14 Transposon Insertion Mutants . *PNAS* **103**, 2833-2838.

Lightbown, J. W. et Jackson, F. L. (1956). Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochem J* **63**, 130-137.

Lind, C., Hochstein, P. et Ernster, L. (1982). DT-diaphorase as a quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch Biochem Biophys* **216**, 178-185.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. et Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microb Infect* **2**, 1051-1060.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. et Pier, G. B. (2002). Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.

Maddula, V. S. R. K., Pierson, E. A. et Pierson, L. S. (2008). Altering the Ratio of Phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) Strain 30-84: Effects on Biofilm Formation and Pathogen Inhibition. *J Bacteriol* **190**, 2759-2766.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**, 47-56.

Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S. et Speert, D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **34**, 1129-1135.

Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. et Ameyama, M. (1979). Membrane-Bound D-Gluconate Dehydrogenase from *Pseudomonas Aeruginosa* Purification and Structure of Cytochrome-Binding From. *J Biochem* **85**, 1173-1181.

Matsushita, K., Yamada, M., Shinagawa, E., Adachi, O. et Ameyama, M. (1983). Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. A KCN-insensitive alternate oxidase chain and its energetics. *J biochem* **93**, 1137-1144.

Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W. et Thomashow, L. S. (2006). Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 417-445.

- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. et 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.
- Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M. et Thomashow, L. S. (1998).** A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas Fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* **180**, 2541-2548.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. et Pierson, L. S. (1992).** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2616-2624.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. et Pesci, E. C. (2000).** The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates Rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* . *J Bacteriol* **182**, 2702-2708.
- Mikkelsen, H., McMullan, R. et Filloux, A. (2011).** The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS* . *PLoS ONE* **6**, 29113.
- Mitchell, G., Séguin, D. L., Asselin, A. E., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S. et Malouin, F. (2010).** *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC microbiol* **10**, 33.
- Morales, D. K., Jacobs, N. J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J. R. et Hogan, D. A. (2010).** Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms . *Mol Microbiol* **78**, 1379-1392.
- Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J., Brockhurst, M. A. et Winstanley, C. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections . *Am J Respir crit care med* **183**, 1674-1679.

Müller, P. K., Krohn, K. et Mühlrad, P. F. (1989). Effects of pyocyanine, a phenazine dye from *Pseudomonas aeruginosa*, on oxidative burst and bacterial killing in human neutrophils. *Inf immun* **57**, 2591-2596.

Muller, M. (2009). Polyphenol cytotoxicity induced by the bacterial toxin pyocyanin: role of NQO1. *Free Rad Biol Med* **47**, 84-91.

Muller, M. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Rad Biol Med* **33**, 1527-1533.

Muller, M. (2006). Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Rad Biol Med* **41**, 1670-1677.

Muller, M. (2011). Glutathione modulates the toxicity of, but is not a biologically relevant reductant for, the *Pseudomonas aeruginosa* redox toxin pyocyanin. *Free Rad Biol Med* **50**, 971-977.

Muller, M., et Sorrell, T. C. (1995). Inhibition of the human platelet cyclooxygenase response by the naturally occurring phenazine derivative, 1-hydroxyphenazine. *Prostaglandins* **50**, 301-311.

Murphy, A. D. et Lang-Unnasch, N. (1999). Alternative Oxidase Inhibitors Potentiate the Activity of Atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 651-654.

Nachlas, M. M., Margulies, S. I. et Seligman, A. M. (1960). A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity. *J biol chem* **235**, 499-503.

O'Malley, Y. Q., Abdalla, M. Y., McCormick, M. L., Reszka, K. J., Denning, G. M. et Britigan, B. E. (2003 a). Subcellular Localization of *Pseudomonas* Pyocyanin Cytotoxicity in Human Lung Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, 420-430.

O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M. et Britigan, B. E. (2003 b). The Pseudomonas Secretory Product Pyocyanin Inhibits Catalase Activity in Human Lung Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, 1077-1086.

O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M. et 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**, 94-103.

Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. et Hassett, D. J. (2000). Role of the Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG Operon in Oxidative Stress Defense and DNA Repair: OxyR-Dependent Regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *J Bacteriol* **182**, 4533-4544.

Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I. et Vasil, M. L. (2002). GeneChip® Expression Analysis of the Iron Starvation Response in Pseudomonas Aeruginosa: Identification of Novel Pyoverdine Biosynthesis Genes. *Mol Microbiol* **45**, 1277–1287.

Ohmori, S., Nawata, Y., Kiyono, K., Murata, H., Tsuboi, S., Ikeda, M., Akagi, R., Morohashi, K. I. et Ono, B. I. 1999. Saccharomyces cerevisiae cultured under aerobic and anaerobic conditions: air-level oxygen stress and protection against stress. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 587-594.

Panozzo, C., Nawara, M., Suski, C., Kucharczyka, R., Skoneczny, M., Bécam, A. M., Rytka, J. et Herbert, C. J. (2002). Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS lett* **517**, 97-102.

Pearson, J. P., Pesci, E. C. et B. H. Iglewski, B. H. (1997). Roles of Pseudomonas Aeruginosa Las and Rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.

Pesci, E. C, Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. et Iglewski, B. H. (1999). Quinolone Signaling in the Cell-to-Cell Communication System of Pseudomonas Aeruginosa. *PNAS* **96**, 11229-11234.

Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., et Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127-3132.

Pierson, L. S. et Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1659-1670.

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol microbiol biotechnol* **3**, 255-264.

Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. et Newman, D. K. (2006). Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat chem biol* **2**, 71-78.

Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. et Newman, D. K. (2007). Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux Through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas Aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**, 6372-6381.

Pukatzki, S., Kessin, R. H. et Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PNAS* **99**, 3159-3164.

Rada, B., Lekstrom, K., Damian, S., Dupuy, C. et Leto, T. L. (2008). The *Pseudomonas* toxin pyocyanin inhibits the Dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J Immunol* **181**, 4883-4893.

Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. et Ausubel, F. M. (1995). Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. *Science* **268**, 1899-1902.

Ramos, I., Dietrich, L. E., Price-Whelan, A. et Newman, D. K. (2010). Phenazines affect biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in similar ways at various scales. *Res microbiol* **161**, 187-191.

Ran, H., Hassett, D. J. et Lau, G. W. (2003). Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *PNAS* **100**, 14315-14320.

Ratjen, F. et Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *The Lancet* **361**, 681-689.

Ray, A, et Williams, H. D. (1997). The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiol lett* **156**, 227-232.

Rella, A., Yang, M. W., Gruber, J., Montagna, M. T., Luberto, C., Zhang, Y. M. et Del Poeta, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Cryptococcus* Species. *Mycopathologia* **173**, 451-461.

Reszka, K. J., O'Malley, Y., McCormick, M. L., Denning, G. M. et Britigan, B. E. (2004). Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* **36**, 1448-1459.

Rich, P. R., Jeal. A. E., Madgwick, S. A. et Moody, A. J. (1990). Inhibitor effects on redox-linked protonations of the b haems of the mitochondrial bc1 complex . *Biochim biophys Acta* **1018**, 29-40.

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S. et Eberl, L. (2001). N-Acylhomoserine-lactone-mediated Communication Between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia* in Mixed Biofilms. *Microbiol* **147**, 3249-3262.

Rodrigues, F., Ludovico, P. et Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism . *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* **6**, 101-121.

Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. et Goffeau, A. (2001). The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 207-214.

Rosenfeld, E. et Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**, 1115-1144.

Rosenthal, V. D., Udwardia, F. E., Muñoz, H. J., Erben, N., Higuera, F., Abidi, K., Medeiros, E. A. et al. (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* **139**, 1757-1763.

Rudkjøbing, V. B., Thomsen, T. R., Alhede, M., Kragh, K. N., Nielsen, P. H., Johansen, U. R., Givskov, M., Høiby, N. et Bjarnsholt, T. (2011). True Microbiota Involved in Chronic Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients Found by Culturing and 16S rRNA Gene Analysis. *J Clin Microbiol* **49**, 4352.

Ryall, B., Lee, X., Zlosnik, j, E. A., Hoshino, S. et Williams, H. D. (2008). Bacteria of the Burkholderia Cepacia Complex Are Cyanogenic Under Biofilm and Colonial Growth Conditions. *BMC Microbiol* **8**, 108.

Sabra, W., Kim, E. J. et Zeng, A. P. (2002). Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* **148**, 3195-3202.

Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M. et Schuster, M. (2007). Social Cheating in *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing. *PNAS* **104**, 15876-15881.

Schobert, M. et Jahn, D. (2010). Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**, 549-556.

Schoental, R. (1941). The Nature of the Antibacterial Agents Present in *Pseudomonas pyocyanea* Cultures. *Br J Exp Pathol* **22**, 137-147.

Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. et Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973-985.

Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**, 48-62.

Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z, Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I. et al. (2006). Genetic Adaptation by *Pseudomonas Aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *PNAS* **103**, 8487-8492.

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. et LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J clin Microbiol* **42**, 2074-2079.

Sriramulu, D. D., Lünsdorf, H., Lam, J. S. et Römling, U. (2005). Microcolony Formation: a Novel Biofilm Model of *Pseudomonas Aeruginosa* for the Cystic Fibrosis Lung. *J Med Microbiol* **54**, 667-676.

Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., et Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**, 159-271.

Stewart-Tull, D. E. S. et Armstrong, A. V. (1972). The Effect Of 1-Hydroxyphenazine And Pyocyanin From *Pseudomonas Aeruginosa* On Mammalian Cell Respiration. *J Med Microbiol* **5**, 67-73.

Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E. H. et Ohman, D. E. (1999). Effect of *rpoS* Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 3890-3897.

Thierbach, G. et Reichenbach, H. (1981). Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration. *Antimicrob Agents Chemother* **19**, 504-507.

Tirouvanziam, R., Conrad, C. K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L. A., Moss, R. B., et Herzenberg, L. A. (2006). High-dose Oral N-acetylcysteine, a Glutathione Prodrug, Modulates Inflammation in Cystic Fibrosis. *PNAS* **103**, 4628-4633.

Tokuda, H. et Unemoto, T. (1984). Na⁺ is translocated at NADH: quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J biol chem* **259**, 7785-7790.

Tredget, E. E., Shankowsky, H. A., Rennie, R., Burrell, R. E. et Logsetty, S. (2004). Pseudomonas infections in the thermally injured patient. *Burns* **30**, 3-26.

Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A. et Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *PNAS* **98**, 6911-6916.

Van Ark, G. et Berden, J. A. (1977). Binding of HQNO to beef-heart sub-mitochondrial particles. *Biochim biophys Acta* **459**, 119-127.

Van Delden, C. et Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Diseases* **4**, 551-560.

Van Zanduycke, S. M., Sohler, P. J. et Smart, K. A. (2002). The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* **123**, 365-373.

Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. et Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *PNAS* **103**, 171-176.

Vinckx, T., Wei, Q., Matthijs, S. et Cornelis, P. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology* **156**, 678-686.

Vitkauskienė, A., Skrodenienė, E., Dambrauskienė, A., Macas, A. et Sakalauskas, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina (Kaunas)* **46**, 490-495.

Voggu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. et Götz, F. (2006). Microevolution of Cytochrome bd Oxidase in Staphylococci and Its Implication in Resistance to Respiratory Toxins Released by *Pseudomonas*. *J Bacteriol* **188**, 8079-8086.

Waksman, S. A. et Woodruff, H. B. (1942). Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin¹. *J Bacteriol* **44**, 373-384.

Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. et Stewart, P. S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317-323.

Wang, Y., Kern, S. E. et Newman, D. K. 2010. Endogenous Phenazine Antibiotics Promote Anaerobic Survival of *Pseudomonas Aeruginosa* Via Extracellular Electron Transfer. *J Bacteriol* **192**, 365-369.

Wang, Y. et Newman, D. K. (2008). Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen. *Environ sci technol* **42**, 2380-2386.

Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. et Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *J Bacteriol* **193**, 3606-3617.

Watson, D., Lindel, D. L. et Fall, R. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* contains an inducible methylcitrate synthase. *Curr Microbiol* **8**, 17-21.

Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B. et Stewart, P. S. (2004). Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *App Environ Microbiol* **70**, 6188-6196.

West, I. C., Mitchell, P. et Rich, P. R. (1988). Electron conduction between b cytochromes of the mitochondrial respiratory chain in the presence of antimycin plus myxothiazol. *Biochim Biophys Acta* **933**, 35-41.

Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. et Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms . *Nature* **413**, 860-864.

Whitfield, C., Sutherland, I. W. et Cripps, R. E. (1982). Glucose Metabolism in *Xanthomonas Campestris*. *J Gen Microbiol* **128**, 981-985.

Williams, H. D., Zlosnik, J. E. et Ryall, B. (2007). Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa* . *Adv Microb Physiol* **52**, 1-71.

Williams, P. et Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**, 182-191.

Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. et 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**, 2515-2517.

Winstanley, C. et Fothergill, J. L. (2009). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS microbiol lett* **290**, 1-9.

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

Wu, H., Ito, K. et Shimoi, H. (2005). Identification and Characterization of a Novel Biotin Biosynthesis Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *App Environ Microbiol* **71**, 6845-6855.

Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. et McFeters, G. A. (1998). Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Is Determined by Oxygen Availability. *App Environ Microbiol* **64**, 4035-4039.

Yeterian, E., Martin. L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L. et Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino acids* **38**, 1447-1459.

Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Allen, H. L. et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms. *Dev Cell* **3**, 593-603.

Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H. R., Chandra, G., Chater, K. F., Dover, L. G., Goh, E. B. et al. (2010). Genome Sequence of the Fleming Strain of *Micrococcus luteus*, a Simple Free-Living Actinobacterium. *J Bacteriol* **192**, 841-860.

Young, T. A., Cunningham, C. C. et Bailey, S. M. (2002). Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys* **405**, 65-72.

Zagallo, A. C. et Wang, C. H. (1967). Comparative glucose catabolism of *Xanthomonas* species. *J bacteriol* **93**, 970-975.

Résumé

La pyocyanine (PYO) est une phénazine de couleur bleu-vert, produite spécifiquement par la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). La toxicité aérobie de la PYO envers les cellules de mammifères, les levures et les bactéries a été décrite de longue date, mais la compréhension des mécanismes d'action est encore lacunaire, en particulier en conditions de limitation en O₂ (conditions rencontrées dans le contexte infectieux). De plus, il a récemment été montré que la PYO peut apporter des effets bénéfiques pour la souche productrice en hypoxie. Au cours de ce travail, nous avons réexaminé les effets de la PYO sur un large panel de bactéries dont son propre producteur (*Pa*) ainsi que sur un modèle cellulaire eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* exposées à différentes tensions en O₂. Nos données suggèrent que la toxicité aérobie de la PYO envers *S. cerevisiae* est multifactorielle, impliquant à la fois une interaction avec le complexe III de la chaîne respiratoire et l'induction d'un stress oxydatif. Pour la première fois, nous avons mis en évidence une toxicité de la PYO exacerbée en anaérobiose chez un eucaryote (*S. cerevisiae*). Le mécanisme d'action impliquerait le PYO radical. Nous avons également montré que la PYO peut inhiber la croissance aérobie et anaérobie des microorganismes concurrents, plus particulièrement *S. aureus* en bloquant le complexe III de la chaîne respiratoire. A l'inverse, la PYO peut stimuler la respiration de *Pa* surtout dans les conditions mimant le contexte infectieux (hypoxie, vie ralentie). Le complexe III et/ou les oxydases terminales cbb₃ serait impliqué favorablement. En conclusion, la PYO jouerait à la fois un rôle de poison hypoxique mais aussi un rôle de navette redox bénéfique pour la survie et la virulence de *Pa* en hypoxie.

Mots clés : pyocyanine, *Pseudomonas aeruginosa*, aérobie, anaérobiose, hypoxie, *S. cerevisiae*, *S. aureus*, respiration, mucoviscidose

Abstract

Pyocyanin (PYO) is a blue-green phenazin, specifically produced by the opportunistic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). Aerobic toxicity of PYO toward mammalian cells, yeast and bacteria has been known for a long time, but the understanding of its mechanisms of action remains unclear, especially in conditions of limited O₂ (conditions encountered during infection). In addition, it has recently been shown that PYO can bring benefits to the producer strain under hypoxia. In this study, we reexamined the effects of PYO toward a large panel of bacteria including its own producer *Pa* as well as a model of eukaryotic cells *Saccharomyces cerevisiae* exposed to different oxygen tensions. Our results suggest that the aerobic toxicity of PYO toward *S. cerevisiae* is multifactorial: involving both interaction with the respiratory chain at the level of complex III and induction of oxidative stress. For the first time, we have shown that PYO exerts an increased toxicity toward the eukaryotic cell, *S. cerevisiae* under anaerobiosis. The mechanism could involve the production of PYO radical. We have also shown that PYO can inhibit the aerobic and anaerobic growth of competing microorganisms, especially *S. aureus* by blocking the complex III of the respiratory chain. Conversely, PYO can stimulate the respiration of *Pa*, in mainly in conditions similar to those encountered during infection (hypoxia, slowed growth). The complex III and/or the cbb₃ oxidases could be favorably involved. To conclude, PYO could act as a hypoxic poison as well as a redox shuttle beneficial for the survival and the virulence of *Pa* under hypoxia.

Keywords: Pyocyanin, *Pseudomonas aeruginosa*, aerobiosis, anaerobiosis, *S. cerevisiae*, *S. aureus*, respiration, cystic fibrosis.