



Dialogue inter-règne entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée. Rôle de la production de L-kynurénine par les bactéries

Charlotte Genestet

► To cite this version:

Charlotte Genestet. Dialogue inter-règne entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée. Rôle de la production de L-kynurénine par les bactéries. Ingénierie biomédicale. Université de Grenoble, 2014. Français. <NNT : 2014GRENS026>. <tel-01557521>

HAL Id: tel-01557521

<https://theses.hal.science/tel-01557521v1>

Submitted on 6 Jul 2017

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie
pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Charlotte GENESTET

Thèse dirigée par **Mme le Docteur Marie José Stasia**
codirigée par **M. le Professeur Benoit Guery**

préparée au sein du **laboratoire TIMC-IMAG, équipe TheREx,
UMR CNRS 5525**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement (EDISCE).**

Dialogue inter-règles entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée – Rôle de la production de L-kynurénine par les bactéries

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2014**, devant le jury
composé de :

M. le Professeur Bertrand TOUSSAINT

PU, Grenoble, Président

M. le Docteur Jamel EL BENNA

PU, Paris, Rapporteur

M. le Professeur Patrick PLESIAT

PU-PH, Besançon, Rapporteur

Mme le Docteur Simona BARZU

Senior scientist, Lyon, Examineur

Mme le Docteur Marie José STASIA

MCU-PH, Grenoble, Directeur de thèse

M. le Professeur Benoit GUERY

PU-PH, Lille, Co-directeur de thèse



Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Bertrand Toussaint, grâce auquel j'ai pu intégrer l'équipe TheREx et qui me fait l'honneur d'être Président de mon jury de thèse. Son expertise et sa disponibilité m'ont été infiniment précieuses.

Je souhaite remercier l'EDISCE pour m'avoir financée pendant ces trois années et l'association « Vaincre la Mucoviscidose » qui a également aidé au financement de ce projet de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame le Docteur Marie José Stasia pour sa gentillesse, sa confiance, son écoute et sa présence au quotidien qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse. La qualité de son encadrement a permis que ce projet se déroule dans les meilleures conditions.

Je remercie également Monsieur le Professeur Benoit Guery qui m'a permis de réaliser cette thèse en acceptant de la codiriger.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Jamel El Benna et Monsieur le Professeur Patrick Plésiat qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Madame le Docteur Simona Barzu qui a accepté d'être examinateur dans mon jury de thèse. Je leur suis reconnaissante du privilège qu'ils me font en acceptant de juger mon travail.

Il existe peu de termes pour exprimer toute ma gratitude envers les membres de l'équipe TheREx, et en particulier les membres de CDiReC, pour leur gentillesse, leurs conseils et leur disponibilité grâce auxquels j'ai pu réaliser ce rêve d'enfance. Une pensée également pour toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu être amenée à collaborer. En un mot comme en cent : MERCI !!!

Un clin d'œil en particulier à mes camarades de promotion Julie et Lionel. Julie, les pauses avec Speedy Gonzales dopé au sucre vont me manquer ainsi que ta gentillesse. Lionel, j'espère que tu vas faire trembler Yamanaka maintenant que ta Némésis s'en va.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'Institut de Biologie et Pathologie, en particulier Sabrina, Sophia et Célia, avec qui j'ai partagé des moments de détente tellement nécessaires pour me faire sortir de mon aquarium.

Je tiens à exprimer toute mon affection et toute ma gratitude à mes Parents qui ont toujours cru en moi et ont été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Merci de m'avoir permis de réaliser ce rêve.

Un immense merci à Baptiste pour m'avoir supportée dans mes moments de doute. Merci pour ta patience et ton écoute. Même toi en tant qu'informaticien, tu pourrais aujourd'hui soutenir cette thèse à ma place, tant tu en as entendu parler au cours de ces trois ans !!!

A Baptiste
A mes Parents

1MT : 1-méthyl-tryptophane
 3-oxo-C12-HSL : N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone
 AHL : Acyl-homosérine lactone
 AhR : récepteurs d'aryl-hydrocarbène
 AIA : Acide indole-3-acétique
 Amp : Ampicilline
 ANCA : AntiNeutrophil Cytoplasmic Autoantibody
 ARNT : AhR Nuclear Translocator
 AsnC : Asparagine synthase C
 BAI1 : Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
 BET : Bromure d'éthidium
 BHA : Butylhydroxyanisole
 BPI : Bactericidal/Permeability-Increasing protein
 BSA : Albumine sérique bovine
 C4-HSL : N-butanoyl-L-homosérine lactone
 CARD : CAspase Recruitment Domain
 Cb : Carbénicilline
 CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand
 CCR : Chemokine (C-C motif) Receptor
 CD : Cluster of Differentiation
 CFF : Cystic Fibrosis Foundation
 CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
 CGD : Chronic Granulomatous Disease
 Cif : CFTR inhibitory factor
 CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
 CPA : Cellules présentatrices d'antigène
 CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
 CX3CR : Chemokine (C-X3-C motif) Receptor
 CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand
 CXCR : Chemokine (C-X-C motif) Receptor
 DC : Cellule dendritique
 DMSO : Diméthylsulfoxyde
 DO : Densité optique
 DR : Double Recombinant
 DTT : Dithiothréitol
 EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
 ERA : Espèces réactives de l'azote
 ESM : Erreur standard à la moyenne
 FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter
 FAD : Flavine adénine dinucléotide
 FGF : Fibroblast Growth Factor
 FI : Facteur d'infection
 Fizz1 : Found in Inflammatory Zone 1
 fMLP : formyl-Méthyl-Leucyl-Phénylalanine
 FRO : Formes réactives de l'oxygène
 GAS : IFN- γ Activating Site
 GATA3 : GATA binding protein 3
 GCN2 : General Growth Nonderepressible 2
 G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
 CGD : Chronic Granulomatous Disease
 Gm : Gentamicine
 GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
 GPR : récepteur couplé aux protéines G
 HBS : HEPES buffered saline
 HBSm: HBS modifié

HGF-1 : Hepatocyte Growth Factor
 HHQ : 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone
 HLA : Human Leukocyte Antigen
 HMGB1 : High-Mobility Group Box protein 1
 HRPO : Horse Radish Peroxidase
 Hsp90 : Heat shock protein 90
 ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
 IDO : Indoléamine-2,3-Dioxygénase
 IFN : Interféron
 Ig : Immunoglobuline
 IGF : Insulin Growth Factor
 IL : Interleukine
 ILC : Innate Lymphoid Cells
 IMF : Intensité moyenne de fluorescence
 IMPa : Immunomodulating Metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa*
 iNOS : induicible Nitric Oxide Synthase
 IPAF : Interleukin-converting enzyme Protease Activating Factor
 IRF : Interferon Regulatory Factor
 ISRE : IFN-Stimulated Response Element
 Kana : Kanamycine
 KC : Keratinocyte Chemoattractant
 KO : Knockout
 LB : Luria Bertani
 LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
 LPS : Lipopolysaccharide
 Lrp : Leucin-responsive regulator protein
 M9M : Milieu M9 Modifié
 MAP : Mitogen-Activated Protein
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MBL : Mannose-Binding Lectin
 MCP : Monocyte Chemotactic Protein
 M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
 MFG-E8 : Milk Fat Globule-EGF factor 8
 MIP : Macrophage Inflammatory Protein
 MMP :Matrix Metalloproteinase
 MPO : Myélopéroxydase
 MR : Récepteur du mannose
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
 MyD88 : Myeloid Differentiation primary response gene (88)
 NAC : N-acétyl-cystéine
 NAD/NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
 NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
 NBT : Nitro bleu de tétrazolium
 NE : Neutrophil Elastase
 NES : Nuclear Export Sequence
 NETs : Neutrophil Extracellular Traps
 NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B
 NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
 NK : Natural Killer
 NLR : NOD-like receptor
 NLS : Nuclear Location Sequence
 NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
 PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
 PAR : Protease-Activated Receptors
 PAS : Per-Arnt-Sim

PBMC : Cellules du sang périphérique mononuclées
 PBS : Phosphate Buffered Saline
 PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
 PFA : Paraformaldéhyde
 PGE2 : Prostaglandine E2
 phox : *phagocytic oxidase*
 PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
 PIA : Pseudomonas Isolation Agar
 PIP2 : Phosphatidylinositol biphosphate
 PIP3 : Phosphatidylinositol triphosphate
 PKB ou C : Protéine Kinase B ou C
 PLC, D ou A2 : Phospholipases C, D ou A2
 PlGF : Placental Growth Factor
 PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
 PMS : Phénazine MéthoSulfate
 PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
 PQS : Pseudomonas Quinolone Signal
 PRR : Pattern Recognition Receptors
 PS : Phosphatidylsérine
 PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
 QS : Quorum Sensing
 RNS : Reactive Nitrogen Species
 ROR γ : RAR-related Orphan Receptor γ
 ROS : Reactive Oxygen Species
 SBO : Syndrome de bronchiolite oblitérante
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule
 SOCS3 : Suppressor Of Cytokine Signaling 3
 SOD : Superoxyde Dismutase
 SP-A ou D : Surfactant Protein A ou D
 SR : Simple Recombinant
 SST3 : Système de Sécrétion de Type III
 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
 Suc : Sucrose/Saccharose
 SVF : Sérum de veau fœtal
 T reg : T régulateur
 TAM : Tyro/Axl/Mer
 TAP : Transport associated Antigen Processing
 Tc : Tétracycline
 TCR : T Cell Receptor
 TDO : Tryptophane-2,3-dioxygénase
 TGF : Tumor Growth Factor
 Th : T helper
 TIM : T cell Immunoglobulin Mucin domain
 TLR : Toll-Like Receptors
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 UFC : Unité Formant Colonie
 URL : Unités Relatives de Luminescence
 VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
 WT : Wild Type
 XRE : Éléments de réponse aux xénobiotiques

INTRODUCTION

PARTIE I : GENERALITES SUR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	1
1 Niches écologiques et mode de vie	1
2 Les infections dues à <i>P. aeruginosa</i>	2
2.1 Modèles d'infection induite par <i>P. aeruginosa</i>	3
2.2 <i>P. aeruginosa</i> et la mucoviscidose	6
2.3 Résistance aux antibiotiques	12
PARTIE II : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ET IMMUNITE	14
1 Mécanisme de défense mécanique	16
1.1 La barrière épithéliale	16
1.1.1 Description générale	16
1.1.2 Spécificités de l'interaction avec <i>P. aeruginosa</i>	16
1.2 Le liquide de surface des voies aériennes	17
1.2.1 Description générale	17
1.2.2 Spécificités de l'interaction avec <i>P. aeruginosa</i>	17
2 Initiation de la réponse immunitaire par les cellules épithéliales	18
2.1 Description générale	18
2.2 Spécificités de l'interaction avec <i>P. aeruginosa</i>	19
3 Défenses immunitaires cellulaires	21
3.1 <i>P. aeruginosa</i> et les neutrophiles	21
3.1.1 Le chimiotactisme	23
3.1.2 La phagocytose	26
3.1.3 La dégranulation	28
3.1.4 La production des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène	32
3.1.5 La NETose	38
3.2 <i>P. aeruginosa</i> et les macrophages	40
3.2.1 Modulation de l'immunité par les macrophages	42
3.2.2 L'efferocytose	53
3.3 <i>P. aeruginosa</i> et les cellules dendritiques	55
3.3.1 Description générale	55
3.3.2 Spécificités de l'interaction avec <i>P. aeruginosa</i>	56
3.4 <i>P. aeruginosa</i> et les lymphocytes	57
3.4.1 Réponses lymphocytaires T helper/auxiliaire	58
3.4.2 Réponse lymphocytaire dans les infections à <i>P. aeruginosa</i> et la mucoviscidose	62
4 Récapitulatif des mécanismes de défense de <i>P. aeruginosa</i> contre le système immunitaire	65

PARTIE III : LA VOIE DES KYNURENINES	67
1 La voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i>	68
1.1 Le métabolisme de tryptophane de <i>P. aeruginosa</i>	68
1.2 La régulation de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i>	71
2 La voie des kynurénines de l'hôte	73
2.1 Généralités.....	73
2.2 La régulation de l'IDO dans les cellules de l'hôte	76
2.2.1 Régulation de l'expression de l'IDO	76
2.2.2 Régulation post-traductionnelle de l'IDO.....	78
2.3 Les récepteurs des métabolites de la voie des kynurénines	79
2.3.1 Les récepteurs d'aryl-hydrocarbène (AhR)	79
2.3.2 Le récepteur couplé aux protéines G : GPR35	82
2.4 La régulation de la réponse immunitaire par la voie des kynurénines de l'hôte	82
2.4.1 Régulation de la réponse immunitaire innée par la voie des kynurénines de l'hôte	83
2.4.2 Régulation de la réponse immunitaire adaptative	85
2.5 Rôle de la voie des kynurénines dans la réponse aux infections bactériennes	88
PARTIE IV : OBJECTIFS	90
 MATERIEL ET METHODES	
PARTIE I : SOUCHES, PLASMIDES ET OLIGONUCLEOTIDES.....	93
1 Souches.....	93
2 Plasmides.....	93
3 Oligonucléotides	94
PARTIE II : CULTURE BACTERIENNE.....	95
1 Milieux de culture et antibiotiques	95
2 Culture de <i>P. aeruginosa</i>.....	96
3 Culture de <i>Escherichia coli</i>.....	96
4 Suivi de la croissance et densité bactérienne.....	96
5 Conservation des souches bactériennes.....	97
6 Traitement des bactéries à l'H₂O₂.....	97
6.1 Traitement des bactéries à l'H ₂ O ₂ en milieu solide	97
6.2 Traitement des bactéries à l'H ₂ O ₂ en milieu liquide	97
PARTIE III : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	98
1 Préparation d'ADN génomique	98
2 Préparation d'ADN plasmidique	98
3 Electrophorèse d'ADN.....	98
4 Extraction des fragments d'ADN.....	98

5	Quantification des acides nucléiques	99
6	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	99
7	Restriction de l'ADN	100
8	Clonage.....	100
8.1	Sous clonage	100
8.2	Ligation.....	101
9	Transformation.....	101
9.1	Choc thermique.....	101
9.2	Electroporation.....	101
10	Mutagenèse par échange allélique chez <i>P. aeruginosa</i>	102
10.1	Echange allélique.....	102
10.2	Conjugaison biparentale.....	102
10.3	Sélection des clones double recombinants.....	103
10.4	Excision de la cassette de résistance	103
11	Insertion d'une fusion transcriptionnelle rapportrice dans le chromosome.....	105
12	Complémentation des mutants.....	106
PARTIE IV : TECHNIQUES DE BIOCHIMIE		106
1	Production et purification de l'enzyme recombinante KynA.....	106
1.1	Production de la protéine recombinante KynA.....	106
1.2	Purification de la protéine recombinante KynA	106
2	Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	107
3	Séparation des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	107
3.1	Principe.....	107
3.2	Préparation des gels de polyacrylamide.....	108
3.3	Préparation des échantillons et migration par électrophorèse	108
3.4	Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide.....	108
4	Western blot.....	109
4.1	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	109
4.2	Révélation des protéines	109
5	Test d'activité de l'enzyme recombinante purifiée KynA	109
5.1	Cinétique enzymatique	109
5.2	Test d'inhibiteurs potentiels.....	110
6	Dosage colorimétrique de la production de kynurénine par <i>P. aeruginosa</i>	110
7	Production d'anions superoxydes en système non-enzymatique	110
8	Mesure de la concentration en H₂O₂.....	111
PARTIE V : TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE.....		112
1	Purification de cellules de l'immunité humaines à partir de sang frais	112

1.1	Purification des neutrophiles humains	112
1.2	Purification des monocytes et lymphocytes humains par tri magnétique	113
1.3	Purification des monocytes par adhésion et différenciation en macrophages.....	113
1.4	Congélation et décongélation de PBMC.....	113
2	Préparation des stimuli solubles et particuliers opsonisés.....	114
2.1	PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) à 2 µg/mL.....	114
2.2	Zymosan opsonisé par du sérum AB humain à 16 mg/ml	114
2.3	Particules de <i>Staphylococcus aureus</i> marquées à l'Alexa fluor 488 opsonisées au sérum AB humain.....	114
2.4	<i>P. aeruginosa</i> opsonisée au sérum AB humain.....	115
3	Phagocytose.....	115
4	Mesure de l'activité NADPH oxydase	115
4.1	Chimiluminescence	115
4.2	Réduction du cytochrome c	117
4.3	Oxygraphie.....	117
5	Bactéricidie	118
6	Activation des macrophages.....	118
7	Analyse de l'activation des macrophages par cytométrie en flux	118
7.1	Principe de la cytométrie en flux	118
7.2	Anticorps utilisés pour l'étude	119
7.3	Protocole de marquage extracellulaire	119
7.4	Protocole de marquage intracellulaire.....	119
8	Analyses statistiques.....	120
 RESULTATS		
PARTIE I : INTERACTION HÔTE/PATHOGENE ENTRE <i>P. AERUGINOSA</i> ET LES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE.....		
122		
1	Métabolisme <i>in vitro</i> de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i>.....	122
1.1	La voie des kynurénines est fonctionnelle dans les souches cliniques.....	122
1.2	La voie des kynurénines est active en fin de phase exponentielle.....	123
1.3	La kynurénine n'est pas sécrétée dans le surnageant via les pompes à efflux.....	124
2	Interaction hôte/pathogène entre <i>P. aeruginosa</i> et les cellules de l'immunité innée.....	125
2.1	La voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i> est activée lors du contact avec les cellules de l'immunité innée	125
2.2	Construction de mutants de la voie des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i>	127
2.3	La kynurénine favorise la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles	129
2.4	La kynurénine inhibe la production de FRO	131

2.5	<i>La kynurénine est un scavenger des FRO.....</i>	133
2.6	<i>La kynurénine est un scavenger des FRO intra et extracellulaires</i>	137
2.7	<i>La kynurénine bactérienne ne permet pas de résistance directe à l'H₂O₂.....</i>	140
2.8	<i>Les neutrophiles n'expriment pas le récepteur de la kynurénine, contrairement aux lymphocytes, aux monocytes et aux macrophages.</i>	141
2.9	<i>La kynurénine favorise l'expression de l'Ahr par les macrophages</i>	143
2.10	<i>La kynurénine favorise le maintien de la population M2c.....</i>	145
3	Discussion.....	150
PARTIE II : ETUDE ENZYMOLOGIQUE DE KYNA		156
1	Production, purification et conservation de l'enzyme recombinante KynA.....	156
1.1	<i>Mise au point de la purification de l'enzyme recombinante KynA.....</i>	156
1.2	<i>Mise au point de la conservation de l'enzyme recombinante KynA.....</i>	157
1.3	<i>Critères de pureté de l'enzyme recombinante KynA.....</i>	159
2	La protéine recombinante KynA est une enzyme allostérique.....	159
3	La protéine recombinante KynA est multimérique	161
4	Le 1MT n'est pas un inhibiteur de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i>	163
4.1	<i>Le L-1MT, mais pas le D-1MT, inhibe partiellement l'activité de l'enzyme recombinante KynA</i>	163
4.2	<i>Le L-1MT n'inhibe pas la production de kynurénine par <i>P. aeruginosa</i></i>	164
5	Discussion.....	165
CONCLUSION / PERSPECTIVES		175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		179
LISTE DES COMMUNICATIONS.....		225

Figure 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Figure 2 : Modèle d'infections induites par <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure 3 : Injection d'exotoxines dans les cellules cibles par le système de sécrétion de type trois de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 4 : Espèces bactériennes colonisant les poumons suivant l'âge des patients atteints de mucoviscidose	8
Figure 5 : Les défenses respiratoires contre les infections pulmonaires à <i>P. aeruginosa</i>	15
Figure 6 : Modèle de persistance de <i>P. aeruginosa</i> , via la nécrose des neutrophiles médiée par les rhamnolipides	23
Figure 7 : Modèle des étapes du recrutement des neutrophiles au site inflammatoire	25
Figure 8 : Modèle de la voie d'activation de la phagocytose de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figure 9 : Caractéristiques des compartiments granulaires des neutrophiles humains	30
Figure 10 : Modèle d'activation de la NADPH oxydase	35
Figure 11 : Modèle des signaux d'activation des macrophages M1	43
Figure 12 : Modèle des signaux d'activation des macrophages M2a	47
Figure 13 : Modèles de la polarisation des macrophages lors de l'infection aiguë (A) ou chronique (B)	50
Figure 14 : Différenciation et production de cytokines par les différentes classes de lymphocytes T helper	58
Figure 15 : La voie des kynurénines.	67
Figure 16 : Le métabolisme du tryptophane chez <i>Pseudomonas spp</i>	68
Figure 17 : Modèle de la régulation de la voie des kynurénines chez <i>P. aeruginosa</i>	72
Figure 18 : Voies du métabolisme du tryptophane chez l'Homme	74
Figure 19 : Mécanisme d'activation des AhR	80
Figure 20 : Expression des AhR par les cellules de l'immunité	81
Figure 21 : Modèle de la régulation de la réponse T helper par la voie des kynurénines	87
Figure 22 : Vue d'ensemble schématique du rôle de la voie des kynurénines dans la réponse aux infections bactériennes	89
Figure 23 : Procédure d'inactivation des gènes par le système cre-lox.	104
Figure 24 : Construction des fusions transcriptionnelles rapportrices.	105
Figure 25 : Mécanisme du système PMS-NADH-NBT	111
Figure 26 : Principe du dosage de l'H ₂ O ₂ par Amplex Red (résorufine).	111
Figure 27 : Réaction d'oxydation du luminol par l'H ₂ O ₂	116
Figure 28 : Structure moléculaire et perméabilité membranaire du luminol et de l'isoluminol	116
Figure 29 : Mesure de la production de kynurénine par les souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	122
Figure 30 : Cinétique de l'activation de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i> lors de la croissance en milieu LB.	123
Figure 31 : Effet du PA β ND sur la sécrétion de kynurénine dans le surnageant.	125
Figure 32 : Activation de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i> lors du contact avec les cellules de l'immunité.	126
Figure 33 : Activation de la voie des kynurénines de <i>P. aeruginosa</i> lors du contact avec des macrophages issus de monocytes humains.	127

Figure 34 : Génération de souches de <i>P. aeruginosa</i> produisant différents niveaux de kynurénine	128
Figure 35 : Impact de la kynurénine sur la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles humains.....	130
Figure 36 : Impact de la kynurénine sur la production de FRO.	132
Figure 37 : Génération de FRO par les neutrophiles suite à la phagocytose des bactéries	134
Figure 38 : Mode d'action de la kynurénine pour l'inhibition de la détection des FRO.....	135
Figure 39 : Scavenging des FRO intra et extracellulaires par la kynurénine bactérienne.....	138
Figure 40 : Scavenging des FRO intra et extracellulaires par la kynurénine synthétique.....	139
Figure 41 : Traitement des bactéries à l'H ₂ O ₂ en milieu solide (A) ou liquide (B).....	141
Figure 42 : Expression du récepteur de la kynurénine, l'Ahr, par les cellules de l'immunité.....	142
Figure 43 : Effet de la kynurénine sur l'expression des AhR par les macrophages.....	144
Figure 44 : Polarisation des macrophages issus de monocytes humains.	146
Figure 45 : Effet de la kynurénine bactérienne sur la polarisation des macrophages.	147
Figure 46 : Effet de la kynurénine synthétique sur la polarisation des macrophages.	149
Figure 47 : Purification de la protéine recombinante KynA.	157
Figure 48 : Cinétique enzymatique de la protéine recombinante KynA.	160
Figure 49 : Etude de la multimérisation de l'enzyme recombinante KynA.	162
Figure 50 : Effet inhibiteur du D et L-1MT sur l'activité de l'enzyme KynA purifiée.	163
Figure 51 : Effet inhibiteur du L-1MT sur la production de kynurénine par <i>P. aeruginosa</i> . .	164
Figure 52 : Arbre phylogénétique des TDO et IDO bactériennes et humaines.....	167
Figure 53 : Alignement des TDO bactériennes et humaine.	168
Figure 54 : Modélisation de la protéine KynA sous forme d'homotétramère	170
Figure 55 : Modélisation de la dimérisation de la protéine KynA	171
Figure 56 : Modélisation du site actif de KynA	172
Figure 57 : Modélisation du site allostérique putatif de KynA	173

Tableau 1 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire de <i>P. aeruginosa</i>	66
Tableau 2 : Liste des souches utilisées dans cette étude.	93
Tableau 3 : Plasmides utilisés dans cette étude.	93
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude.	94
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux et leurs conditions d'utilisation.	119
Tableau 6 : Marqueurs de la polarisation des macrophages.....	145
Tableau 7 : Comparaison de l'activité enzymatique de la protéine recombinante KynA après stockage dans différents tampon de conservation.	158
Tableau 8 : Critères de pureté de la protéine recombinante KynA.	159
Tableau 9 : Comparaison de la TDO de <i>P. aeruginosa</i> avec les homologues fonctionnels bactériens et humain.	166

INTRODUCTION

PARTIE I : GENERALITES SUR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

1 Niches écologiques et mode de vie

Pseudomonas aeruginosa, aussi appelé « bacille pyocyanique », a été découvert par Carle Gessard en 1882. Il s'agit d'une bactérie Gram-négative, de 1 à 5µm de long et 0,5 à 1µm de large, possédant un flagelle monotriche polaire (**Figure 1**). Ce bacille a la capacité de se développer à des températures allant de 4 à 45°C, avec une croissance optimale entre 30 et 37°C. Elle tolère également des variations de pH de l'environnement. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Elle peut également survivre en anaérobie, en utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électrons (Vasil, 1986).



Figure 1 : *Pseudomonas aeruginosa*
© Dennis Kunkel/Microscopy, Inc.

P. aeruginosa est une des bactéries pathogènes les plus versatiles étudiées à ce jour. Son large génome de 5,2 à 7 Mb a été entièrement séquencé (Stover et al., 2000), révélant un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation (senseurs environnementaux et facteurs de transcription). En effet, 8,4% du génome de *P. aeruginosa* est dédié à la régulation, contre 5 à 6% pour les autres bactéries de façon générale. De nombreux gènes sont également impliqués dans les fonctions métaboliques. Cette bactérie contient la plus forte proportion de gènes régulateurs observés pour un génome bactérien, avec un grand nombre de gènes impliqués dans le catabolisme, le transport et l'efflux de composés organiques, ainsi que quatre systèmes de chimiotaxie potentiels. Tout ceci confère une grande adaptabilité à cette bactérie. En effet, il s'agit d'une bactérie ubiquitaire, qui a la capacité de coloniser de nombreuses niches écologiques. Elle est présente dans l'eau douce, les sols, sur les surfaces

inorganiques, sur les végétaux, dans les intestins de l'Homme et des animaux (Green et al., 1974).

P. aeruginosa possède deux modes de vie distincts. Le mode de vie planctonique, où elle est mobile grâce au flagelle et aux pili, et le mode de vie communautaire, où elle perd sa mobilité, adhère à une surface ou s'agrège avec d'autres bactéries et forme un biofilm.

A retenir :

- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram-négative
- Il s'agit d'une des bactéries pathogènes les plus versatiles étudiées à ce jour
- Sa grande adaptabilité fait d'elle une bactérie ubiquitaire
- *P. aeruginosa* possède deux modes de vie distincts : planctonique et en biofilm

2 Les infections dues à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa peut infecter une large variété d'hôtes : plantes, amibes, insectes et mammifères tel que l'Homme (Apidianakis and Rahme, 2009; Pukatzki et al., 2002; Rahme et al., 1995). Cette bactérie opportuniste infecte les personnes immunodéprimées (cancer, SIDA, ...), en soins intensifs, les grands brûlés et les patients atteints de mucoviscidose. Elle peut également coloniser une grande variété des tissus et générer des infections pulmonaires, oculaires, urinaires, intestinales, des infections des plaies (brûlures et sites opératoires) et générer des bactériémies (Bodey et al., 1983; Branski et al., 2009). De plus, elle peut être la cause de méningites et d'ostéomyélites (Carek et al., 2001). Sa grande adaptabilité fait qu'elle est très présente en milieu hospitalier (colonisation des robinets et des surfaces, résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques). Du fait de cette colonisation et de la diversité des tissus infectés, *P. aeruginosa* est le 3^{ème} pathogène responsable de maladies nosocomiales (en France, en 2012, 8,4% des infections nosocomiales et 14% en réanimation). Elle représente par exemple 18,1% des infections pulmonaires, 6,9% des infections urinaires et 44,1% des infections de la peau et des tissus mous en milieu hospitalier (Rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire 2012).

P. aeruginosa peut générer des infections aiguës et chroniques selon les facteurs de virulence exprimés et selon l'efficacité de la réponse immunitaire (Hauser et al., 2011; Williams et al., 2010), et peut passer d'un type d'infection à l'autre (**Figure 2**).

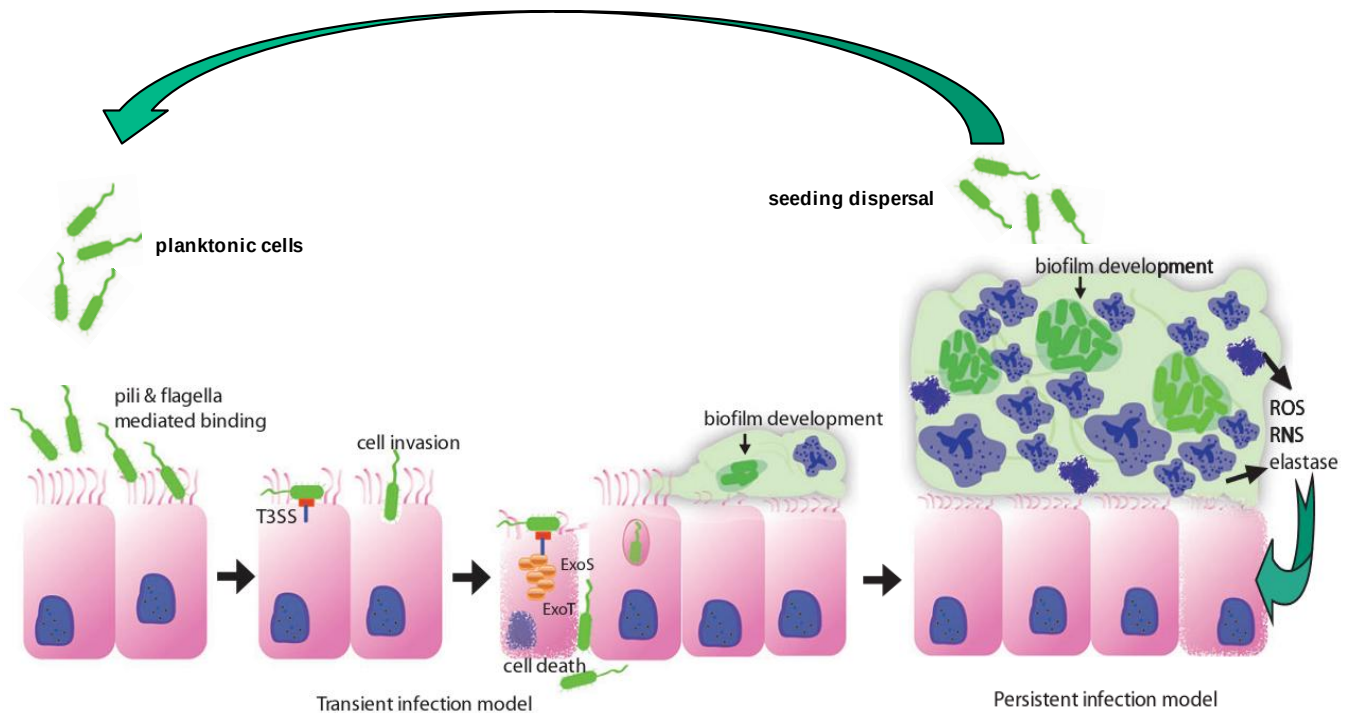


Figure 2 : Modèle d'infections induites par *P. aeruginosa* (inspiré de Williams et al., 2010)

Lors d'une infection, les bactéries planctoniques peuvent se fixer à l'épithélium grâce aux pili et au flagelle. Cytotoxique à ce stade, *P. aeruginosa* injecte des exotoxines dans les cellules de l'hôte grâce au système de sécrétion de type III (T3SS) et cause la mort cellulaire. Les bactéries forment ensuite un biofilm et s'organisent en microcolonies. Le biofilm protège *P. aeruginosa* contre le système immunitaire et les antibiothérapies, permettant à cette bactérie de générer une infection chronique/persistante. Les colonies formées par *P. aeruginosa* représentent un stimulus inflammatoire fort. Cela entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et le relargage de protéases par les neutrophiles, ce qui cause des dommages aux tissus environnants. Des bactéries isolées issues des colonies peuvent se disperser et se propager de proche en proche, engendrant la formation de nouvelles colonies. T3SS : système de sécrétion de type III ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; RNS : espèce réactives de l'azote.

A retenir :

- *P. aeruginosa* peut infecter une large variété d'hôtes et une large variété de tissus chez l'Homme
- Il s'agit d'une bactérie pathogène opportuniste
- *P. aeruginosa* est le 3^{ème} pathogène responsable d'infections nosocomiales
- Ce pathogène peut générer des infections aiguës et chroniques

2.1 Modèles d'infection induite par *P. aeruginosa*

Les infections aiguës sont des infections transitoires caractérisées par un mode de vie planctonique, avec une forte multiplication des bactéries. Ces dernières sont invasives et cytotoxiques à ce stade, exprimant de nombreux facteurs de virulence qui entraînent le recrutement et également l'activation de cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles.

Les molécules adhésives telles que le flagelle et les pili permettent à *P. aeruginosa* de s'attacher à la surface des cellules. Les bactéries expriment également des facteurs de virulence tels que le système de sécrétion de type III (SST3) permettant la sécrétion et l'injection de toxines dans les cellules de l'hôte (**Figure 3**). Cela génère des dommages cellulaires, une modulation de l'immunité des muqueuses et de la réponse des cellules de l'immunité via les exotoxines injectées.

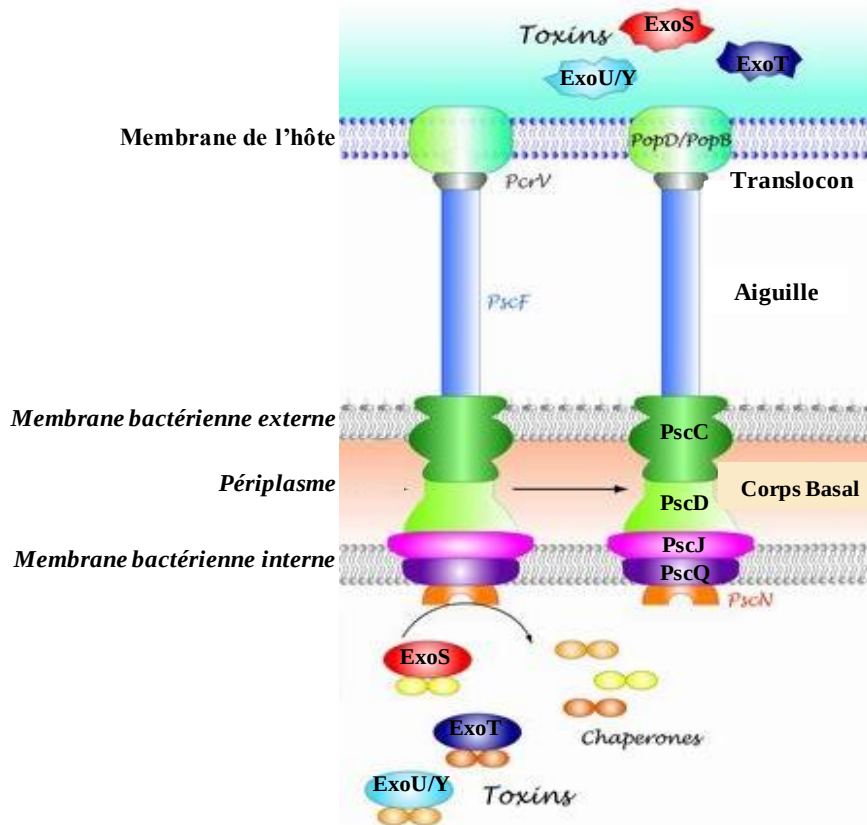


Figure 3 : Injection d'exotoxines dans les cellules cibles par le système de sécrétion de type trois de *P. aeruginosa*

Le SST3 est ancré dans les deux membranes de la bactérie grâce au corps basal. Ce dernier se compose de deux anneaux. Le premier est ancré dans la membrane interne et le deuxième est ancré dans la membrane externe de la bactérie. L'aiguille est formée de la protéine PscF. Les protéines du translocon (PcrV et PopB/PopD) permettent de traverser la membrane de la cellule hôte. Les exotoxines de *P. aeruginosa* ExoS, ExoT, ExoU ou ExoY sont associées à des chaperonnes dans le cytoplasme de la bactérie avant d'être injectées directement à l'intérieur de la cellule cible via le SST3.

Selon le statut immunitaire du patient, ces facteurs de virulence de *P. aeruginosa* peuvent conduire à une ouverture au niveau des jonctions des cellules épithéliales et entraîner une bactériémie. D'autre part, via le quorum sensing (QS), un mécanisme par lequel les bactéries coordonnent leur réponse de manière dépendante de leur densité grâce à des "phéromones" régulatrices, les bactéries sécrètent une matrice extracellulaire afin de former

un biofilm induisant la formation de microcolonies. Trois systèmes de QS de *P. aeruginosa* sont connus à ce jour. Deux sont basés sur la production de N-acyl-L-homosérine lactone (AHL). La production de N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) est contrôlée par le système *las* et la production de N-butanoyl-L-homosérine lactone (C4-HSL) est contrôlée par le système *rhl*. Le troisième signal est basé sur la production de 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline (HHQ) et est connu sous le nom de PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). Ces trois systèmes sont inter-régulés. Le système *las* active le système *rhl* et le PQS, le PQS peut activer le système *rhl* de façon dépendante et indépendante du système *las* et le système *rhl* inhibe le PQS (Jimenez et al., 2012). Le QS régule l'expression de 136 gènes codant pour de nombreux systèmes de virulence qui jouent un rôle dans la tolérance aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte, via, entre autre, la production de biofilm (Alhede et al., 2014). Le biofilm forme une matrice extracellulaire composée de polysaccharides (l'alginate et les polysaccharides Pel et Psl), de protéines et d'ADN, permettant la formation de colonies (Colvin et al., 2012; Whitchurch et al., 2002; Wingender et al., 2001). Il a longtemps été considéré que les bactéries doivent adhérer à une surface pour former un biofilm, or dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose les bactéries n'adhèrent pas à l'épithélium mais forment plutôt des agrégats (Alhede et al., 2011; Bjarnsholt et al., 2009). Le QS joue un rôle déterminant dans la mise en place d'une infection chronique par les bactéries.

Les infections chroniques peuvent être définies comme des infections persistantes, résistantes aux thérapies antibiotiques et au système immunitaire, pouvant perdurer des années. A l'inverse des infections aiguës, les infections chroniques sont caractérisées par un mode de vie communautaire ou en biofilm, qui permet cette résistance aux antibiotiques et au système immunitaire (Høiby et al., 2010). En effet, chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont caractérisées par un phénotype mucoïde, qui permet la formation de biofilm dans les voies aériennes (Bjarnsholt et al., 2009). Ce phénotype peut être, par exemple, acquis via la mutation du gène *mucA* qui entraîne une surproduction d'alginate responsable du phénotype mucoïde et cette mutation peut être engendrée par le peroxyde d'hydrogène produit par les neutrophiles (Mathee et al., 1999). De plus, les bactéries sont non invasives et non cytotoxiques, avec une perte du flagelle, des pili et du SST3, une modification du LPS (lipopolysaccharide, un facteur de virulence associé à la membrane des bactéries, fortement immunogène) permettant d'échapper au système immunitaire, et une adaptation du métabolisme.

Les microcolonies formées par *P. aeruginosa* représentent un stimulus inflammatoire fort, mais sont résistantes à l'action des neutrophiles. Ces derniers sécrètent des formes réactives de l'oxygène (FRO), des espèces réactives de l'azote (ERA) ainsi que des protéases (tel que l'élastase), causant des dommages aux tissus environnants, mais échouant à éliminer les bactéries. Egalement, le stress oxydant généré par les neutrophiles peut engendrer des cassures de l'ADN double brin, favorisant ainsi l'apparition de souches hyper-mutables (Boles and Singh, 2008). Par ailleurs, les neutrophiles morts peuvent représenter une source de substrat pour les bactéries, permettant leur croissance et fournissant du matériel pour la formation du biofilm (Walker et al., 2005).

En outre, le mode de vie en biofilm peut servir de réservoir de bactéries. En effet, des bactéries isolées issues de microcolonies peuvent se disperser et se propager de proche en proche, engendrant la formation de nouvelles colonies. Ceci entraîne des épisodes d'exacerbation et, par conséquent, un cercle vicieux pro-inflammatoire générant des dommages tissulaires pouvant conduire à la destruction des poumons, dans le cadre de la mucoviscidose par exemple.

A retenir :

- Lors d'une infection aiguë les bactéries sont invasives et cytotoxiques
- Lors d'une infection chronique les bactéries sont non invasives et non cytotoxiques
- Le quorum sensing joue un rôle déterminant dans la formation de biofilm
- Le biofilm permet aux bactéries de se protéger de l'action du système immunitaire et des antibiotiques pour générer une infection persistante

2.2 *P. aeruginosa* et la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie héréditaire autosomique récessive, la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne, avec plus de 6000 patients recensés en France et 70.000 dans le monde, en 2012. Cette maladie a pour origine la mutation du gène codant pour la protéine membranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Cette protéine est exprimée à la membrane des cellules épithéliales des voies aériennes, intestinales et reproductrices et des glandes sudoripares, pancréatiques et salivaires. Le CFTR est un canal de passage des ions chlorures AMPc-dépendant (Quinton, 1983). Il module également de nombreux autres canaux ioniques et protéines de transport (Briel et al., 1998; Mehta, 2005).

Plus de 1900 mutations ont été identifiées et divisées en six classes selon le défaut qu'elles entraînent sur la maturation ou la structure de la protéine CFTR (Fajac and Sermet-Gaudelus, 2013; Munck, 2013). Les mutations de classe 1 causent un défaut de synthèse de la protéine, dû à un codon stop anormal sur l'ARN messager. Les mutations de classe 2 entraînent des anomalies du trafic intracellulaire, un défaut de maturation et une dégradation prématurée. La mutation la plus courante, delta F508 ($\Delta F508$), appartient à cette classe. En France et en Europe, il a été estimé que 80% des patients atteints de mucoviscidose sont porteurs de cette mutation sur au moins un allèle. Les mutations de classe 3 induisent un défaut de régulation de la protéine CFTR. La mutation $\Delta F508$ peut également être comptée dans cette catégorie, car si la protéine mutée arrive à la membrane elle a également un fonctionnement défectueux. Les mutations de classe 4 génèrent un défaut de conductance, c'est-à-dire de fonctionnalité de la protéine. Les mutations de classe 5 génère une quantité diminuée de CFTR à la membrane des cellules, dû à un défaut de stabilité de l'ARN et les mutations de classe 6 sont caractérisées par un turn-over augmenté du CFTR, en raison d'un défaut de stabilité de la protéine. En résumé, les mutations de classe 1, 2, 5 et 6 entraînent des anomalies de la quantité de protéine CFTR présente à la membrane et les mutations de classe 3 et 4 entraînent des défauts de fonction de la protéine CFTR exprimée à la membrane. Egalement, les mutations des classes 4, 5 et 6 sont généralement associées à un phénotype clinique moins sévère que les mutations des classes 1, 2 ou 3 (Fajac and Sermet-Gaudelus, 2013; Zielenski and Tsui, 1995).

La mucoviscidose est caractérisée par une insuffisance pancréatique, une obstruction des voies biliaires, une obstruction intestinale, une stérilité chez les mâles, une diminution de la fertilité chez les femelles, la formation de polypes nasaux, la sinusite chronique (Collins, 1992). Par ailleurs, dans le poumon, la mutation du CFTR entraîne un défaut de transport des ions chlorures, qui génère une augmentation de l'absorption de sodium, conduisant ainsi à une déshydratation du mucus, augmentant la viscosité de ce dernier. Ceci perturbe le phénomène de clairance ciliaire, favorisant la colonisation bactérienne. De plus, il a été suggéré que le CFTR est également un récepteur de *P. aeruginosa* permettant l'initiation de l'ingestion par les cellules épithéliales (Pier et al., 1997). Cette internalisation des bactéries par l'épithélium des voies respiratoires fait partie des mécanismes de défense de l'hôte. Cela permet de minimiser la charge bactérienne dans les voies respiratoires des poumons normaux. Ces phénomènes conjugués expliquent la charge bactérienne pulmonaire élevée chez les patients atteints de mucoviscidose.

P. aeruginosa est le pathogène prédominant chez les patients atteints de mucoviscidose dès l'âge adulte, aussi bien en France (**Figure 4A**) qu'aux Etats Unis (**Figure 4B**) par exemple. Comme décrit précédemment, après une première phase invasive de la bactérie, entraînant un afflux de neutrophiles et de macrophages alvéolaires, le terrain propice des patients atteints de mucoviscidose va permettre l'établissement de biofilm par les bactéries, entraînant leur persistance. Cela génère un phénomène d'inflammation, avec des phases d'exacerbations, conduisant à la destruction progressive des parois bronchiques et à une insuffisance respiratoire grave (Hauser et al., 2011; Williams et al., 2010).

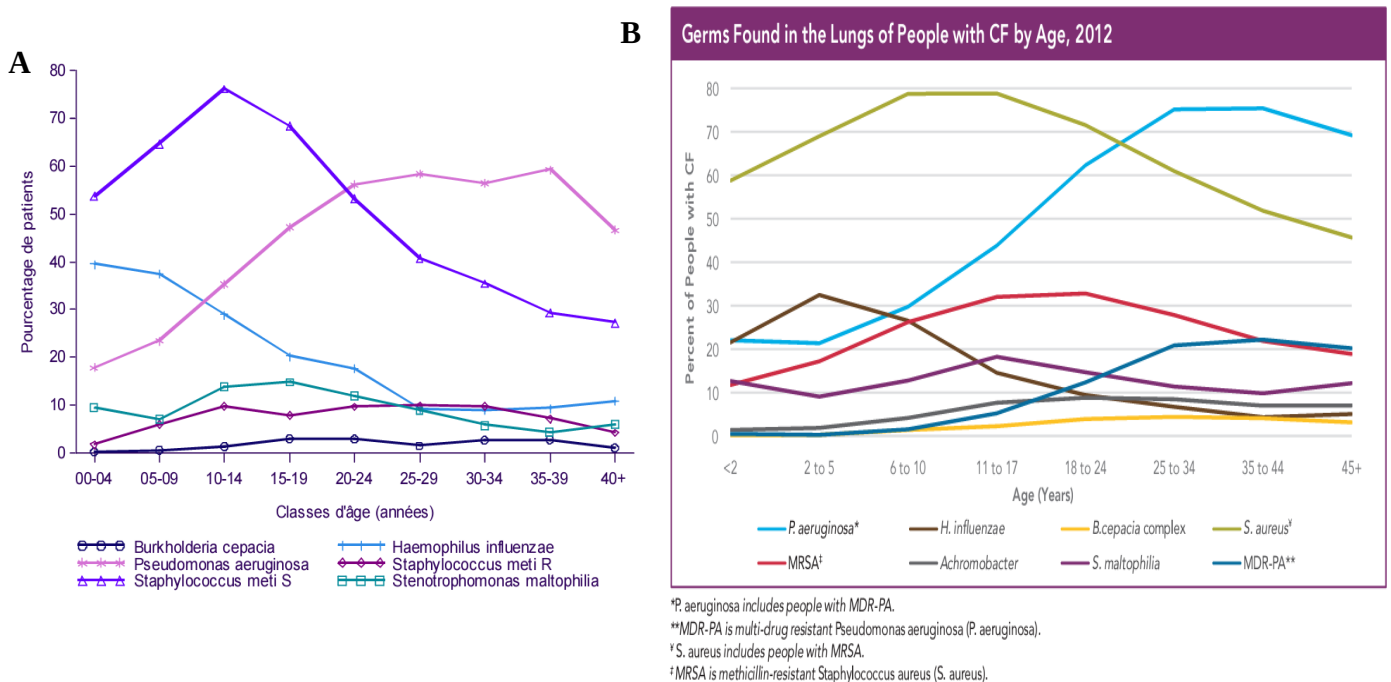


Figure 4 : Espèces bactériennes colonisant les poumons suivant l'âge des patients atteints de mucoviscidose

A. Observatoire National de la mucoviscidose, Bilan des données 2012, Vaincre la mucoviscidose, France. B. Patient Registry, annual data report 2012, Cystic Fibrosis Foundation, USA. En France et aux USA, le pathogène prédominant durant l'enfance est *Staphylococcus aureus* et à l'âge adulte *P. aeruginosa* est le pathogène prédominant chez les patients atteints de mucoviscidose

Le microbiome pulmonaire, c'est-à-dire les micro-organismes (bactériens aérobie et anaérobies, fongiques et viraux) présents dans les poumons, a fait l'objet de nombreuses recherches récemment, afin de mieux comprendre les facteurs responsables des phases d'exacerbation. Une étude réalisée sur 17 patients a mis en évidence 170 genres bactériens, dont 12 représentent 90% de la charge bactérienne totale parmi tous les prélèvements (Price et al., 2013). Il a été montré que la composition et la diversité de la communauté microbienne est un meilleur indicateur de la progression de la maladie que la présence de *P. aeruginosa* en

soi. Cependant, la présence de ce pathogène est associée à une perte de diversité du microbiome (Klepac-Ceraj et al., 2010). Au cours du temps, un changement a été observé chez les patients atteints de mucoviscidose, montrant une perte de diversité du microbiome avec l'âge, avec des bactéries plus réfractaires aux traitements et une dominance de *P. aeruginosa* mucoïde, ceci étant associé à une accélération du déclin des fonctions pulmonaires (Hampton et al., 2014). Lorsque *P. aeruginosa* est le pathogène dominant, cela est associé à un microbiome spécifique (Rogers et al., 2014). Cette dominance de *P. aeruginosa* et ce microbiome spécifique peuvent être en partie expliqués par les interactions pathogène/pathogène au sein du microbiome, qui peuvent être coopératives ou compétitives. Par exemple, *P. aeruginosa* coopère avec *Burkholderia cenocepacia* en favorisant leur persistance mutuelle (McGuigan and Callaghan, 2014). Au contraire, les souches mucoïdes empêchent la croissance de *Staphylococcus aureus*. De plus, *P. aeruginosa* produit de la pyocyanine, connue pour avoir un pouvoir antibiotique et produit des quinolones capables d'inhiber la croissance de *Candida albicans* entre autre (McGuigan and Callaghan, 2014; Méar et al., 2013). Les études menées sur la corrélation entre le microbiome pulmonaire et les phases d'exacerbation chez les patients atteints de mucoviscidose sont contradictoires. Deux études ont mis en avant une composition de la communauté microbienne très similaire entre les phases d'exacerbation et l'état clinique stable (Fodor et al., 2012; Price et al., 2013). En outre, les microbiomes selon les patients étant très divers, il est difficile de mettre en avant une signature microbienne universelle d'exacerbation (Price et al., 2013). Bien que l'abondance totale ou relative de *P. aeruginosa* ne semble pas associée aux phases d'exacerbation, il y a tout de même une corrélation entre l'amélioration des fonctions pulmonaires et la diminution de la charge de *P. aeruginosa* (Reid et al., 2013; Zemanick et al., 2013). Une étude a mis en avant un lien avec les bactéries du genre *Gemella*, montrant une augmentation de l'abondance relative de ces bactéries pendant les phases d'exacerbation pour 24 patients sur 29 testés (Carmody et al., 2013). Une autre étude s'est concentrée sur le rôle des virus. Cela a permis de mettre en évidence que la détection du rhinovirus est associée à la survenue d'exacerbations (Goffard et al., 2014). D'autres équipes se sont intéressées à l'impact des traitements antibiotiques sur le microbiome pulmonaire, avec à nouveau des résultats contradictoires. Une étude a mis en avant une faible diminution de la richesse des espèces et un changement minime dans la structure de la communauté microbienne suite aux traitements antibiotiques (Fodor et al., 2012). Une autre étude s'est intéressée aux changements dans le microbiome suite au traitement des exacerbations par injection intraveineuse d'antibiotique. Dans les jours suivant le traitement, une diminution de

l'abondance relative de *P. aeruginosa* est observée, ainsi qu'une augmentation de la diversité microbienne. Cependant, après 8 à 10 jours, la composition de la communauté microbienne est similaire à celle précédant le traitement (Smith et al., 2014). A l'inverse, une étude a mis en avant, dans des conditions similaires, un changement dans la population des bactéries anaérobies (Zemanick et al., 2013). L'étude du microbiome pourrait permettre de mettre en place des marqueurs prédictifs de l'exacerbation, mais surtout la mise en place d'antibiothérapies mieux ciblées. Ainsi, cela pourrait potentiellement permettre la manipulation du microbiome des patients atteints de mucoviscidose, dans le but d'améliorer, ou au moins de ralentir, la détérioration de leurs fonctions pulmonaires.

Plusieurs thérapies sont à l'étude dans le but de corriger le défaut de la protéine CFTR. Il s'agit de thérapies dites personnalisées car elles dépendent de la classe de mutations responsables de la mucoviscidose (Fajac and Sermet-Gaudelus, 2013; Munck, 2013). Dans le cadre des mutations de classe 1, le but est de "court-circuiter" le codon stop et d'ajouter un acide aminé au lieu d'arrêter la traduction. Dans ce cadre, la molécule PTC124 ou ataluren est en cours d'évaluation dans des essais cliniques. Pour des mutations de classe 2, c'est le développement d'un "correcteur" permettant le trafic et l'expression du CFTR à la membrane qui est visé. La molécule VX-809 ou lumacaftor a fait l'objet d'études cliniques, mais n'a qu'un effet modeste. Concernant les mutations de classe 3 et 4, c'est le développement de "potentiators" qui est à l'étude, dans le but d'activer la fonctionnalité du canal chlorure. L'ivacator, commercialisé en France sous le nom de Kalydeco®, est indiqué dans le cas de patients portant la mutation G551D, qui comprend 3 à 4% des patients. De plus, il est apparu que l'association d'un "correcteur" et d'un "potentioteur" peut être intéressante dans le cadre de la mutation $\Delta F508$, qui est la plus courante chez les patients atteints de mucoviscidose, et un essai clinique de phase 3 a été mené (Boyle et al., 2014). Selon la CFF (Cystic Fibrosis Foundation), ces études cliniques ont montré des améliorations significatives de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de la mutation $\Delta F508$ et vont faire l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché par la société pharmaceutique fin 2014. En outre, une étude clinique de phase 3, basée sur une administration par voie inhalée de liposome contenant le gène *cftr*, est en cours en Angleterre (Kmietowicz, 2012). Le but de cette thérapie génique est d'insérer le gène normal dans le noyau des cellules du patients, avec l'avantage d'être indépendant de la classe de mutation (Armstrong et al., 2014).

Malgré les progrès réalisés dans le but de corriger la mutation à l'origine de la mucoviscidose, actuellement les traitements sont principalement symptomatiques. Les

infections bactériennes sont traitées grâce à des cocktails d'antibiotiques administrés par différentes voies. En Europe, le traitement le plus courant contre les infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose est une combinaison de β -lactamine injectable, associée à une fluoroquinolone ou un aminoside. Les traitements par voie inhalée par aérosol, Tobramycine®, Colimycine ou en poudre Tobi Podhaler®, sont de plus en plus utilisés pour limiter d'une part la toxicité mais aussi apporter le principe actif directement au niveau du site de l'infection, augmentant ainsi la concentration locale. Ces traitements sont en pratique au long cours mais sont aussi utilisés lors des exacerbations. Plusieurs autres molécules sont en cours de développement par voie inhalée (amikacine, ciprofloxacine, etc). L'azithromycine est également utilisée dans le cadre des infections chroniques, ayant un effet surtout anti-inflammatoire et d'inhibiteur du QS de *P. aeruginosa* (Nalca et al., 2006). L'ensemble de ces traitements est associé aux autres mesures indispensables qui sont la kinésithérapie de drainage bronchique, l'hydratation et la pratique d'une activité physique adaptée (Elborn et al., 2009; Kerem et al., 2005; Smyth et al., 2014). Du fait des nombreux mécanismes de résistance développés par *P. aeruginosa* (discutés plus loin), de nouvelles stratégies de lutte contre ce pathogène sont étudiées (Hurley et al., 2012). Une de ses stratégies est justement de cibler ces mécanismes de résistance, en inhibant la formation de biofilm par exemple, grâce à de l'alginate lyase qui décompose l'alginate ou via des inhibiteurs du QS qui permettent également de restreindre l'adaptation des bactéries à leur environnement. Différentes stratégies de vaccination ciblant des structures de *P. aeruginosa*, comme le flagelle, le SST3 ou la porine OprF, sont actuellement en phase clinique ou pré-clinique (Döring et al., 2007; Grimwood et al., 2014; Jiang et al., 2014; Westritschnig et al., 2014). Des anticorps ciblant le SST3 sont également à l'étude (Milla et al., 2014). Une autre méthode est de cibler le métabolisme de la bactérie et plus précisément le métabolisme du fer, qui joue un rôle clé chez *P. aeruginosa*, en utilisant en synergie un chélateur du fer et un antibiotique (Halwani et al., 2008). Par ailleurs, des études sont menées sur l'utilisation du fer comme cheval de Troie afin d'améliorer la pénétration des antibiotiques dans ces bactéries (Baco et al., 2014).

En cas d'atteinte trop importante des fonctions pulmonaires, une greffe de poumon doit être effectuée. Cependant, il a été observé dans de nombreuses études l'apparition d'infections précoces chez les patients transplantés, dans les trois premiers mois suivant la transplantation. Il s'agit majoritairement de pneumonies bactériennes, le pathogène le plus courant étant *P. aeruginosa* (Aguilar-Guisado et al., 2007; Campos et al., 2008; He et al., 2013; Parada et al., 2010; Pison et al., 2014). Les pathogènes peuvent provenir de colonisations résiduelles de

la cavité thoracique, des voies respiratoires supérieures, des sinus ou de la cavité orale (Burguete et al., 2013; Rivas Caldas and Boisramé, 2014). Cependant, il a été mis en avant qu'il existe une relation complexe entre le microbiome et le syndrome de bronchiolite oblitérante (SBO) dont souffrent les patients transplantés. Il semblerait que les risques de SBO ne soient pas directement liés à *P. aeruginosa*, mais soient plus faibles chez les transplantés dont le microbiome est similaire au microbiome du transplant. En revanche, l'acquisition d'une souche de *P. aeruginosa de novo* est plus susceptible de conduire à une infection aiguë des voies respiratoires et à des lésions prédisposant ainsi les patients à l'apparition de SBO (Botha et al., 2008; Willner et al., 2013). Une large étude européenne est actuellement en cours afin de mieux comprendre les problèmes de réinfection des patients transplantés et d'isoler des marqueurs prédictifs du dysfonctionnement pulmonaire chronique de l'allogreffe. Certains de ces marqueurs pourraient être le microbiome pulmonaire avant et après greffe, la polarisation des macrophages ou encore des marqueurs environnementaux (Pison et al., 2014).

A retenir :

- La mucoviscidose est une maladie héréditaire qui a pour origine la mutation du gène codant pour la protéine CFTR
- Cette mutation conduit à une augmentation de la viscosité du mucus, favorisant la colonisation bactérienne pulmonaire
- Il existe 6 classes de mutations, selon le défaut qu'elles entraînent sur la maturation ou la structure de la protéine CFTR, et des thérapies visant à rétablir l'activité de la protéine sont à l'étude
- *P. aeruginosa* est le pathogène prédominant chez les patients atteints de mucoviscidose
- La présence de *P. aeruginosa* est associée à une perte de diversité du microbiome pulmonaire
- Actuellement, les traitements des patients atteints de mucoviscidose sont principalement symptomatiques, avec des cocktails d'antibiotiques
- Les patients ayant reçu une greffe pulmonaire sont souvent réinfectés par *P. aeruginosa*

2.3 Résistance aux antibiotiques

Au cours des dernières décennies, suite à l'utilisation d'antibiothérapies répétitives contre *P. aeruginosa*, des souches multi-résistantes aux antibiotiques sont apparues. Cette bactérie a développé de nombreux mécanismes d'échappement (inactivation enzymatique, blocage de l'accès aux cibles, mutations) (Morita et al., 2014; Poole, 2011). Les infections par ces souches multi-résistantes posent un problème majeur, entraînant l'échec des antibiothérapies.

Le système le plus connu d'inactivation enzymatique utilisé par *P. aeruginosa* est la production de β -lactamase. Cette enzyme permet de cliver les antibiotiques de la famille des β -lactamines (Jeannot et al., 2013; Livermore, 1995). Certaines souches de *P. aeruginosa* produisent également de la carbapénémase, un type de β -lactamase, permettant d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes (Fournier et al., 2013). De plus, certaines souches produisent une enzyme appelée AME (aminoglycoside-modifying enzyme), permettant l'inactivation des aminosides, tels que la tobramycine, par phosphorylation, acétylation ou adénylation (Poole, 2005).

Comme cela a été dit précédemment, la formation de biofilm par les bactéries est un mécanisme très important dans la résistance à une large gamme d'antibiotiques, en empêchant ces molécules d'entrer au contact avec leur cible. De plus, *P. aeruginosa* est capable d'induire la formation de biofilm en réponse à certains antibiotiques, tels que la ciprofloxacine, la tétracycline ou les aminoglycosides (Hoffman et al., 2005; Linares et al., 2006). Un autre mécanisme connu permettant le blocage de l'accès aux cibles est un système d'exportation active par transporteurs membranaires : les pompes à efflux. Ce système permet également la résistance à une large gamme d'antibiotiques (Morita et al., 2001). A nouveau, certains de ces antibiotiques induisent l'expression de ce système de défense des bactéries, comme la tétracycline, le chloramphénicol et les aminoglycosides (Guénard et al., 2014; Morita et al., 2014). Pour résister aux antibiotiques de type carbapénème (qui ne sont pas inactivés par la β -lactamase), *P. aeruginosa* peut perdre ou altérer sa porine OprD qui sert de porte d'entrée à ce type d'antibiotiques (Muller et al., 2011; Rodríguez-Martínez et al., 2009).

Un des autres mécanismes de résistance aux antibiotiques de la bactérie est l'altération des cibles par mutation. Dans la cadre de la résistance aux polymyxines, comme la colistine, le lipide A du LPS va être substitué par l'aminoarabinose (Miller et al., 2011). Pour résister aux fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine, c'est l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui vont être mutées (Jacoby, 2005). Les bactéries peuvent également acquérir un phénotype "hypermutable", via la mutation des gènes responsables de la réparation des mésappariements (*mutS*, *mutL*, *uvrD*) (Oliver et al., 2002). Les mutations peuvent également survenir dans le système GO (DNA oxidative repair), via les gènes *mutT* et *mutY*, générant une "hypermutabilité" des souches lors de l'exposition à un environnement pro-inflammatoire, dans le cadre d'une infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose par exemple (Mandsberg et al., 2009). Ces phénotypes hypermutables permettent une meilleure adaptation de *P. aeruginosa* à son environnement de façon générale (Oliver and Mena, 2010). En outre, cette bactérie a un "cœur de génome" très stable, mais possède un génome dit

"accessoire" très variable. Ce génome accessoire permet l'acquisition de gènes par transfert horizontal, entraînant l'acquisition de gène de résistance et permettant une meilleure adaptation à son environnement (Klockgether et al., 2011).

Certaines études tendent à montrer que l'éradication de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose permet l'amélioration de la santé des patients et de leurs fonctions pulmonaires (Davidson et al., 2012). Il est donc important de trouver de nouvelles stratégies de lutte contre ce pathogène.

A retenir :

- Des souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* sont apparues au cours des dernières décennies
- *P. aeruginosa* échappe à l'action des antibiotiques par différentes stratégies : inactivation enzymatique, blocage de l'accès aux cibles, altération des cibles par mutation
- Son éradication permettrait une amélioration de la santé des patients atteints de mucoviscidose
- De nouvelles stratégies de lutte contre *P. aeruginosa* sont nécessaires

PARTIE II : PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET IMMUNITÉ

Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* (**Figure 5**) :

- Les mécanismes de défense mécanique, qui permettent de piéger les pathogènes dans le mucus et de les rejeter par "l'ascenseur mucociliaire", grâce aux cellules épithéliales
- Les mécanismes de défense de l'épithélium, permettant la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire via la sécrétion de cytokines et de chimiokines
- Les mécanismes de défenses cellulaires, qui comprennent la réponse immunitaire innée via les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques et la réponse immunitaire adaptative via les lymphocytes

Lors de l'infection, les différents acteurs de l'immunité interagissent directement ou via la sécrétion de cytokines et de chimiokines, dans le but d'éliminer les pathogènes.

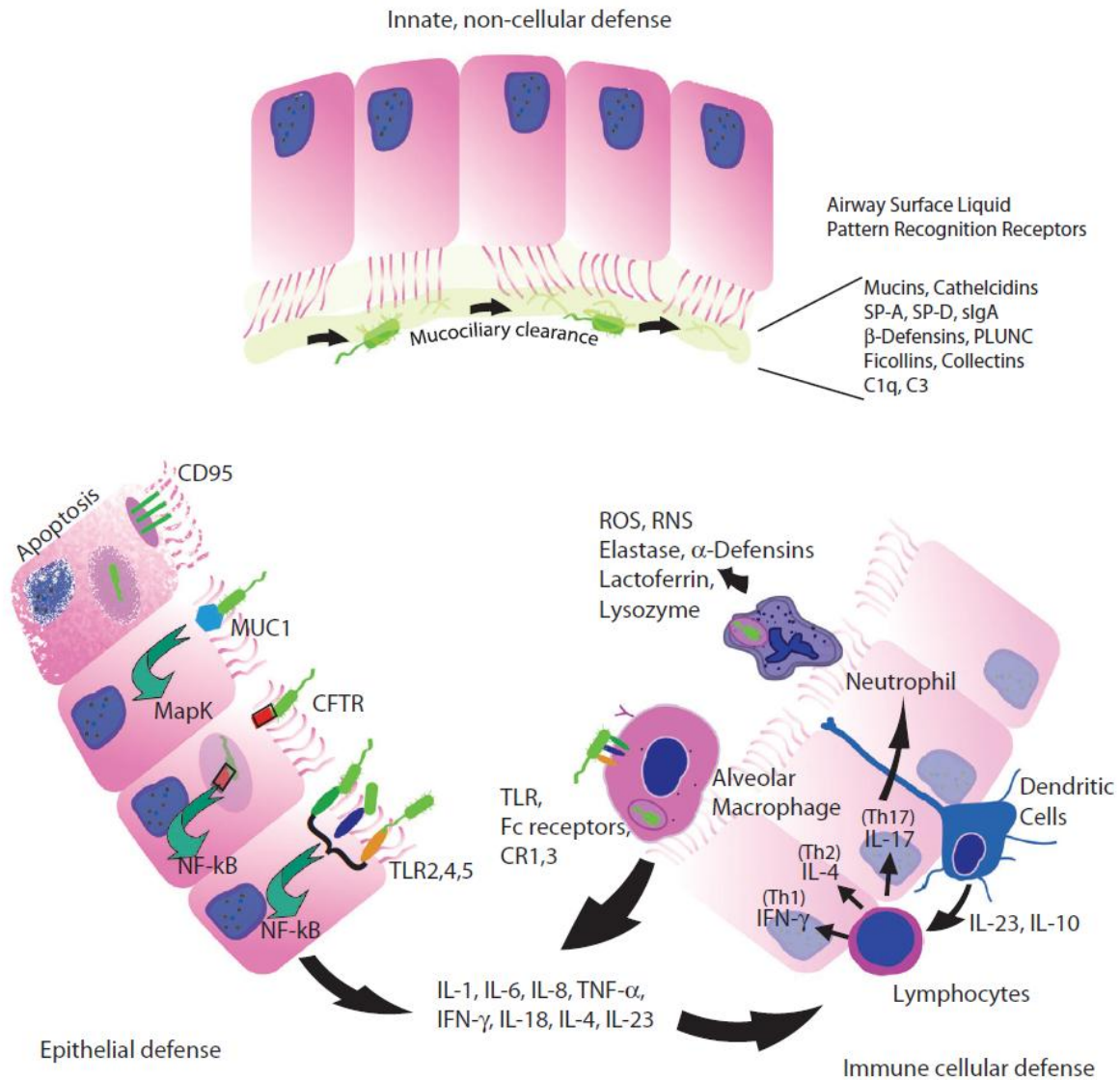


Figure 5 : Les défenses respiratoires contre les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* (Williams et al., 2010)

Les défenses respiratoires contre *P. aeruginosa* nécessitent de nombreux mécanismes de réponse à l'infection : mécanique, épithéliale, cellulaire innée et adaptative. La première ligne de défense est la défense mécanique via le liquide de surface des voies aériennes et l'ascenseur mucociliaire. Le liquide de surface des voies aériennes contient une myriade de molécules "anti-Pseudomonas", qui peuvent détecter, marquer et détruire ce pathogène. Les cellules épithéliales peuvent entrer en apoptose lors de l'ingestion de *P. aeruginosa* pour empêcher sa dissémination. En outre, en plus de son rôle de barrière mécanique, l'épithélium est la source de la plupart des agents microbicides du liquide de surface des voies aériennes. L'épithélium exprime également des récepteurs transmembranaires permettant la détection de *P. aeruginosa* et la mise en place de la réponse immune grâce à la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Parmi les cellules de l'immunité impliquées dans la clairance de *P. aeruginosa*, les neutrophiles sont l'un des composants les plus critiques dans la clairance de ce pathogène. Les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques modulent la réponse immunitaire grâce aux cytokines produites et à l'orientation de la réponse T helper/auxiliaire. Parmi les trois principaux sous-types de lymphocytes T impliqués dans la réponse de l'hôte, les Th17 sont de plus en plus étudiés pour leur capacité à réguler la réponse des neutrophiles.

1 Mécanisme de défense mécanique

1.1 La barrière épithéliale

1.1.1 Description générale

Au niveau des muqueuses, l'épithélium est constitué de cellules étroitement juxtaposées et polarisées qui forment une barrière naturelle contre les pathogènes. Les cellules épithéliales sont constituées d'une région apicale à l'interface avec le milieu extracellulaire et d'une région basolatérale qui comprend les surfaces en regard d'une autre cellule et de la lame basale. Les jonctions serrées définissent la frontière entre partie apicale et basolatérale et assurent l'étanchéité de la barrière cellulaire.

Les cellules épithéliales sécrètent du mucus et de l'eau, formant le liquide de surface des voies aériennes qui permet de piéger les micro-organismes, les polluants, etc. Le battement des cils, situés dans la région apicale des cellules épithéliales, permet d'éliminer les micro-organismes via l'ascenseur mucociliaire, prévenant ainsi l'entrée des pathogènes. Il s'agit d'un processus très important car les facteurs de virulence utilisés par les bactéries nécessitent une phase d'attachement, ou au moins de rester au même endroit un certain temps, afin de sécréter des toxines en quantité suffisante. Les patients atteints de mucoviscidose ou de dyskinésie ciliaire primitive ont une clairance mucociliaire déficiente et sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes (Williams et al., 2010).

1.1.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède tout un arsenal de facteurs de virulence qui cause des dommages aux cellules épithéliales, altère la réparation tissulaire, favorise la dissémination (Kipnis et al., 2006; Lau et al., 2005). Les phénazines et les rhamnolipides sécrétés par les bactéries peuvent entraîner un dysfonctionnement du battement des cils des cellules épithéliales (Azghani et al., 2000; Lau et al., 2004; Read et al., 1992). Via le SST3, *P. aeruginosa* peut injecter des exotoxines provoquant l'apoptose des cellules cibles, la perturbation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et une inhibition de la division cellulaire (Engel and Balachandran, 2009). L'exotoxine A, après translocation dans la cellule, inhibe la synthèse protéique via la fixation sur le facteur d'élongation EF-2 (Kipnis et al., 2006). Les phospholipases agissent en synergie avec les rhamnolipides, des détergents des phospholipides, qui facilitent ainsi l'accès à leur cible. Les phospholipases déstabilisent la

membrane des cellules, entraînant leur mort (Boles et al., 2005). Les lectines solubles sécrétées par *P. aeruginosa* ont également un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales (Bajolet-Laudinat et al., 1994). Un type d'acyl-homosérine lactone, le 3-oxo-C12-HSL, qui a d'abord été identifié comme faisant partie des "phéromones" bactériennes participant au quorum sensing, a également la capacité d'altérer l'intégrité de la barrière épithéliale ainsi que la migration des cellules épithéliales (Holm and Vikström, 2014; Karlsson et al., 2012; Vikström et al., 2006). En outre, la sécrétion de protéases, comme l'élastase bactérienne, permet le clivage de l'élastine et du collagène, détruisant les jonctions entre les cellules épithéliales et pouvant conduire à une septicémie (Azghani et al., 2000; Nomura et al., 2014).

1.2 Le liquide de surface des voies aériennes

1.2.1 Description générale

Le liquide de surface des voies aériennes joue également un rôle dans la clairance bactérienne via les molécules microbicides qu'il contient, qui permettent de détecter, marquer et détruire le pathogène. Les molécules du complément, telles que le fragment C3, les protéines du surfactant (SP-A et SP-D) et les lectines liant le mannose (MBL) permettent l'activation du système du complément. Cela conduit à l'opsonisation des bactéries (ce qui facilite la reconnaissance par l'immunité innée) et à la formation du complexe d'attaque membranaire, deux processus qui tiennent un rôle important dans l'élimination de *P. aeruginosa* (Dorfman et al., 2008; Kuroki et al., 2007). Le mucus contient également des défensines, des peptides cationiques courts, qui ont une activité antimicrobienne via la perméabilisation des membranes (Ganz, 2004).

1.2.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

A nouveau, *P. aeruginosa* possède plusieurs facteurs de virulence permettant d'inactiver ces molécules antimicrobienne, diminuant ainsi la réponse de l'hôte. Les élastases bactériennes et les sérines-protéases (tel que la protéase IV) permettent d'inactiver les immunoglobulines telles que les IgA et les IgG ainsi que les composés du complément et de cliver les protéines SP-A et SP-D (Engel et al., 1998; Heck et al., 1990; Hong and Ghebrehwet, 1992; Malloy et al., 2005; Mariencheck et al., 2003). De plus, *P. aeruginosa*

produit une protéase alcaline empêchant l'activation du complément par la voie classique et la voie des lectines (Laarman et al., 2012). Ceci permet l'inhibition de l'opsonisation des bactéries et de l'activation du système du complément et participe donc à l'échappement au système immunitaire.

A retenir :

- L'épithélium forme une barrière naturelle contre les pathogènes
- Le liquide de surface des voies aériennes piège les pathogènes, qui sont éliminés par l'ascenseur mucociliaire
- Le liquide de surface des voies aériennes contient une myriade de molécules "anti-*Pseudomonas*" capables de détecter, marquer et détruire *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* possède plusieurs mécanismes de défense permettant de tuer les cellules épithéliales, perturber l'intégrité de l'épithélium et inhiber le battement des cils
- *P. aeruginosa* peut également inactiver et cliver les opsonines présentes dans le liquide de surface des voies aériennes

2 Initiation de la réponse immunitaire par les cellules épithéliales

2.1 Description générale

En plus du rôle de défense mécanique, les cellules épithéliales servent à détecter les microorganismes et aident ainsi à la mise en place de la réponse de l'hôte.

Plusieurs structures microbiennes conservées, connues sous le nom de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), sont impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire innée de l'hôte contre *P. aeruginosa*. Les PAMP sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptors), qui incluent, entre autre, les récepteurs de surface et endosomiques les TLR (Toll-Like Receptors) et les NLR (NOD-like receptor). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité. Quatre TLR sont connus pour être impliqués dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* : TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9, qui reconnaissent respectivement les pili, le LPS, le flagelle et l'ADN CpG des bactéries internalisées. Lorsqu'il y a liaison d'un des PAMP avec un TLR, cela entraîne une activation de la voie NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), de façon MyD88 dépendante (Takeda and Akira, 2004). Le complexe protéique NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la mise en place de la réponse inflammatoire. Via l'activation de cette voie, les cellules épithéliales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor), l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-6, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), et des chimiokines, telles que l'IL-8 qui permet le recrutement des

neutrophiles et MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) qui participe au recrutement des monocytes/macrophages. Cela permet le recrutement des cellules de l'immunité et leur activation (Cheng et al., 2007; Häcker et al., 2000). Concernant les NLR, il a été montré que c'est le récepteur NLRC4 qui est impliqué dans la reconnaissance de *P. aeruginosa*. L'activation via NLRC4 conduit à l'assemblage d'une plateforme de haut poids moléculaire permettant l'activation de la caspase 1. La caspase 1 permet la maturation protéolytique de l'IL-1 β et de l'IL-18, participant à la réponse inflammatoire (Faure et al., 2014; Sutterwala et al., 2007). Les mécanismes mis en jeu dans la reconnaissance et l'impact sur la réponse immunitaire sont décrits plus loin.

2.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

La reconnaissance par les TLR est un système de signalisation redondant. Il a été montré que les souris déficientes en TLR2 ou TLR4 ont une réponse cytokinique et/ou une réponse inflammatoire diminuée, mais peuvent éliminer *P. aeruginosa*. En outre, les souris déficientes pour ces deux récepteurs sont hyper-sensibles uniquement à une souche de *P. aeruginosa* ne possédant pas de flagelle (stimulant le TLR5) et les souris WT ne sont pas hypersensibles à cette souche bactérienne (Ramphal et al., 2008; Skerrett et al., 2007). Il y a donc un mécanisme de redondance entre les TLR2, 4 et 5. Étonnement, il a été montré que la déficience en TLR9 protège les souris contre les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. Le TLR9 jouerait un rôle néfaste dans la défense de l'hôte, diminuant l'activité des macrophages alvéolaires, la production d'IL-1 β et d'oxyde nitrique (NO) qui sont nécessaires à l'élimination de la bactérie (Benmohamed et al., 2014).

Les bactéries peuvent aussi être détectées par le CFTR des cellules épithéliales. Cela permet l'initiation de l'internalisation et, comme pour les TLR, entraîne l'activation de la voie NF- κ B (Schroeder et al., 2002). Également, le récepteur MUC1 permet la détection de la flagelline de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales. L'activation de la voie des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases qui en découle entraîne une cascade de phosphorylation puis une réponse pro-inflammatoire, avec la sécrétion, entre autre, d'IL-8 (Azghani et al., 2000; Lillehoj et al., 2004). Par ailleurs, les cellules épithéliales utilisent l'apoptose comme mécanisme de défense pour éliminer les cellules qui ont été envahies par des agents pathogènes. Ce mécanisme d'apoptose, induit par l'interaction de CD95 (ou Fas) avec CD95 ligand (ou Fas ligand), s'est révélé être critique dans l'élimination de *P. aeruginosa*. En effet,

les souris déficientes pour CD95, CD95 ligand ou ayant un défaut dans l'activation de ce récepteur, développent une septicémie plus rapidement que les souris WT après infection par *P. aeruginosa* (Anathy et al., 2014; Grassmé et al., 2000).

En plus du défaut de clairance ciliaire, la mutation du CFTR impacte d'autres mécanismes chez les cellules épithéliales. Il a été montré que la mutation du CFTR est associée à une activation constitutive de la voie NF- κ B, même en l'absence de stimuli microbiens, ainsi qu'à une réponse exacerbée aux produits microbiens (Cohen and Prince, 2012). La voie des MAP kinases, et plus particulièrement p38 MAPK, est plus fortement activée dans les cellules épithéliales de patients atteints de mucoviscidose lors de la stimulation par *P. aeruginosa* sous forme de biofilm (Beaudoin et al., 2013; Bérubé et al., 2010). L'activation exagérée de ces deux voies de signalisation génère une réponse pro-inflammatoire exacerbée ainsi qu'un recrutement important des neutrophiles, participant aux dommages tissulaires observés chez les patients atteints de mucoviscidose. Parallèlement, il a été mis en évidence que la production d'interféron (IFN) de type I est diminuée dans les cellules épithéliales déficientes en CFTR. L'activation des cellules dendritiques (DC), dépendante de l'IFN- β , est donc diminuée, pouvant avoir un impact sur la réponse immunitaire adaptative (Parker et al., 2012a).

Lors de la phase de transition de l'infection aiguë vers une infection persistante ou chronique, *P. aeruginosa* s'adapte afin d'échapper au système immunitaire (Cigana et al., 2011). Cela implique la perte de la motilité des bactéries via la perte des pili et du flagelle (ligands des TLR 2, TLR5 et MUC1), qui entraîne une diminution de la réponse de l'hôte et une augmentation des risques d'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose (Amiel et al., 2010; Bragonzi et al., 2009). La modification du LPS (ligand du TLR4) le rendant moins immunogène aide également à l'échappement au système immunitaire (Cigana et al., 2009). Le SST3, dont l'exotoxine ExoS est impliquée dans l'activation des TLR2 et 4 (Epelman et al., 2004), est régulé négativement lors de l'infection chronique. La formation du biofilm par les bactéries, comme expliqué précédemment, permet également d'échapper aux mécanismes de reconnaissance par l'immunité (Lyczak et al., 2002). De plus, il a été montré que le LPS de *P. aeruginosa* peut induire l'expression du TLR2 ce qui a pour conséquence d'augmenter la magnitude de la réponse pro-inflammatoire envers les bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* (Shin et al., 2013). Ceci peut faire partie des interactions au sein du microbiome pulmonaire, permettant à *P. aeruginosa* de prendre l'avantage sur d'autres espèces bactériennes en manipulant la réponse de l'hôte. A

l'inverse, *P. aeruginosa* peut coopérer avec d'autres bactéries du microbiome comme *Porphyromonas gingivalis* pour induire l'apoptose des cellules épithéliales. En effet, en cas de co-invasion par ces deux types de pathogènes, cela engendre une augmentation de la mort cellulaire (Li et al., 2014). Egalement, pour contrecarrer la mise en place de la réponse immunitaire par les cellules épithéliales, *P. aeruginosa* peut sécréter des phénazines, modulant la réponse inflammatoire via l'inhibition de la production de CCL5 (Chemokine (C-C motif) Ligand 5) et MCP-1, deux chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes et des monocytes/macrophages respectivement (Denning et al., 2003). De plus, la pyocyanine, un type de phénazine, inactive la catalase des cellules épithéliales et participe ainsi au stress oxydant (Lau et al., 2004; O'Malley et al., 2004). *P. aeruginosa* produit une protéine nommée Cif (CFTR inhibitory factor), qui réduit la sécrétion d'ions chlorures en empêchant la desubiquitination de la protéine CFTR qui est ensuite dégradée par le lysosome (Bomberger et al., 2011). Cela peut également avoir un impact sur la reconnaissance de *P. aeruginosa*. La protéine Cif peut aussi avoir une incidence sur la présentation de l'antigène par le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I en induisant une dégradation par le protéasome de son transporteur TAP (Transport associated Antigen Processing), qui est un transporteur ABC comme le CFTR. Cela entraîne une diminution de la reconnaissance des cellules épithéliales infectées par des virus par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Bomberger et al., 2014).

A retenir :

- *P. aeruginosa* est reconnu par les TLR2, 4, 5 et 9, le NLRC4, MUC1 et le CFTR
- La reconnaissance du pathogène par les cellules épithéliales induit la production et la sécrétion de cytokines et de chimiokines par ces cellules
- L'apoptose des cellules épithéliales ayant internalisé des bactéries, dépendante de CD95/CD95 ligand, permet de limiter la charge bactérienne pulmonaire
- *P. aeruginosa* échappe à la détection par le système immunitaire grâce à la perte du flagelle, des pili, du SST3, la modification du LPS et la formation de biofilm
- *P. aeruginosa* sécrète des molécules qui peuvent moduler la réponse inflammatoire

3 Défenses immunitaires cellulaires

3.1 *P. aeruginosa* et les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles représentent 50 à 70% des leucocytes circulants. Ces phagocytes, recrutés dès les premières heures de l'infection, possèdent tout un arsenal

permettant la neutralisation et l'élimination des pathogènes. Ils sont connus pour avoir une durée de vie courte, cependant il a été montré récemment que leur durée de vie n'est pas de quelques heures, mais plutôt de quelques jours (Pillay et al., 2010). Les neutrophiles sont connus pour avoir un rôle clé dans la réponse contre *P. aeruginosa*. En effet, chez les souris neutropéniques, 10 à 100 UFC (Unité Formant Colonie) sont suffisantes pour générer une infection pulmonaire mortelle, alors que chez les souris normales 10^7 à 10^8 UFC sont nécessaires (Koh et al., 2009). De plus, il y a une accumulation de neutrophiles dans les fluides respiratoires de patients atteints de mucoviscidose et il y a une corrélation inverse entre la croissance de *P. aeruginosa* dans le poumon et la concentration en neutrophiles qui entourent les bactéries (Koller et al., 2009; Kragh et al., 2014). Egalement, il a été mis en avant que chez ces patients les bactéries agrégées en biofilm sont entourées de neutrophiles et que les bactéries planctoniques, quant à elles, sont rapidement phagocytées (Bjarnsholt et al., 2009).

En réponse, *P. aeruginosa* a développé plusieurs mécanismes provoquant la mort des neutrophiles afin d'échapper à leur activité bactéricide. Via le SST3, les bactéries injectent des exotoxines dans les neutrophiles, et aussi dans les macrophages, induisant une oncose de ces cellules via la destruction de leur cytosquelette (Dacheux et al., 1999, 2000). De plus, le 3-oxo-C12-HSL a également la capacité d'induire l'apoptose des neutrophiles et des macrophages (Tateda et al., 2003). La pyocyanine peut aussi induire l'apoptose des neutrophiles (Allen et al., 2005), via une inhibition de l'acidification du lysosome (Prince et al., 2008). Par ailleurs, les rhamnolipides ont la capacité d'induire une nécrose de ces cellules de l'immunité (Jensen et al., 2007). En outre, *P. aeruginosa* se protège des neutrophiles grâce au biofilm. Ces deux derniers mécanismes agissent en synergie. En effet, l'exposition de *P. aeruginosa* en biofilm aux neutrophiles *in vitro* entraîne une augmentation significative de la production de rhamnolipides par ces bactéries (Alhede et al., 2009). Les rhamnolipides forment une sorte de bouclier protégeant les bactéries en induisant la nécrose des neutrophiles. Ces derniers libèrent alors de l'ADN extracellulaire, dont les bactéries peuvent se servir afin de "consolider" le biofilm (Walker et al., 2005) et renforcer ainsi leur résistance au système immunitaire et aux antibiotiques (**Figure 6**), générant un cercle vicieux permettant la persistance de *P. aeruginosa* (Alhede et al., 2014).

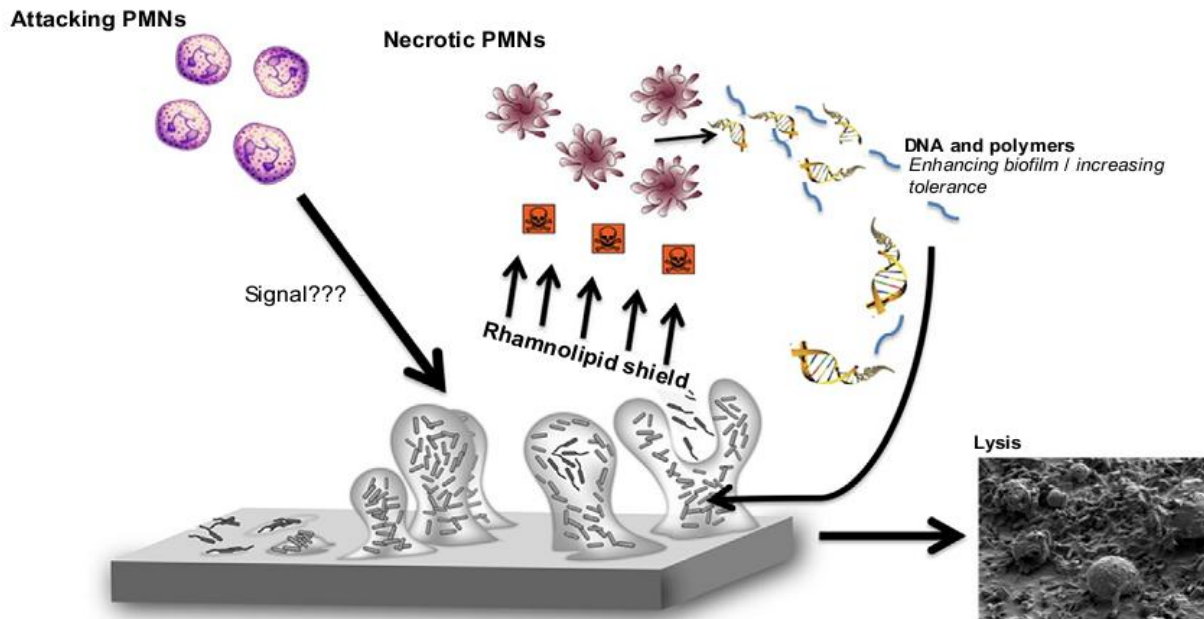


Figure 6 : Modèle de persistance de *P. aeruginosa*, via la nécrose des neutrophiles médiée par les rhamnolipides (Alhede et al., 2014)

Lors du contact de *P. aeruginosa*, sous forme de biofilm, avec les neutrophiles, les bactéries produisent des rhamnolipides qui constituent une sorte de bouclier. En effet, les rhamnolipides induisent la nécrose des neutrophiles, qui libèrent alors de l'ADN extracellulaire. Cet ADN est utilisé par *P. aeruginosa* pour renforcer le biofilm, augmentant la résistance de ces bactéries au système immunitaire et aux antibiothérapies. Ceci génère un cercle vicieux permettant la persistance de *P. aeruginosa*.

A retenir :

- Les neutrophiles ont un rôle clé dans la clairance de *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* possède plusieurs mécanismes pour induire la mort des neutrophiles (SST3, molécules du QS, pyocyanine, rhamnolipides)
- *P. aeruginosa* peut utiliser l'ADN des neutrophiles mort pour renforcer son biofilm et favoriser ainsi sa persistance

3.1.1 Le chimiotactisme

3.1.1.1 Description générale

Au site d'infection, les signaux inflammatoires dérivés des bactéries ou de l'hôte sont abondants. Le LPS ou les peptides formylés issus des bactéries comme le fMLP (formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine) et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17 favorisent la production et l'expression de molécules d'adhésion du côté luminal des cellules endothéliales : les P-sélectines, E-sélectines et les membres de la superfamille des intégrines les ICAM (InterCellular Adhesion Molecule). De plus, il a été montré que l'IL-17, en synergie avec le TNF- α , accroît la production par les cellules endothéliales de chimiokines

telles que CXCL1 (Chemokine (C-X-C motif) Ligand), CXCL2 et CXCL5 qui se fixent au récepteur CXCR2 ((C-X-C motif) Chemokine Receptor) des neutrophiles (Griffin et al., 2012). Les neutrophiles, à leur surface, expriment constitutivement la PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) et la L-sélectine permettant la liaison avec les P et E-sélectines de l'endothélium (Borregaard, 2010). Cette première liaison entraîne une phase de "rolling" des neutrophiles le long de l'endothélium. Dans le contexte d'une infection, lors de cette phase de rolling, les neutrophiles sont au contact de chimioattractants tels que des produits bactériens (fMLP, le LPS) et des produits inflammatoires issus de l'hôte (le leucotriène B4, l'IL-8, les fragments du complément, etc.). Cela induit une activation des neutrophiles, entraînant un regroupement des β 2-intégrines, LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) et Mac-1, à la surface des neutrophiles (Constantin et al., 2000). Ces intégrines se lient à l'endothélium grâce aux récepteurs ICAM entraînant une adhésion ferme des neutrophiles. Finalement, ces derniers réorganisent leur cytosquelette pour s'insinuer à travers la couche de cellules endothéliales, guidés par un gradient de concentration de chimioattractants: c'est la migration transendothéliale ou la diapédèse. Beaucoup de molécules chimioattractantes entraînent également un "priming" des neutrophiles (Amulic et al., 2012). Le "priming" permet une réponse plus rapide et plus intense des neutrophiles lors de l'exposition à un second stimulus. Cela permet d'une part une réponse rapide et efficace pour éliminer les pathogènes, mais d'autre part peut entraîner la production d'une grande quantité de formes réactives de l'oxygène (FRO) et donc causer des dommages aux tissus environnants (El-Benna et al., 2008; Hurtado-Nedelec et al., 2014). Une fois sur le site d'inflammation, les neutrophiles sont activés et peuvent détruire les pathogènes (**Figure 7**).

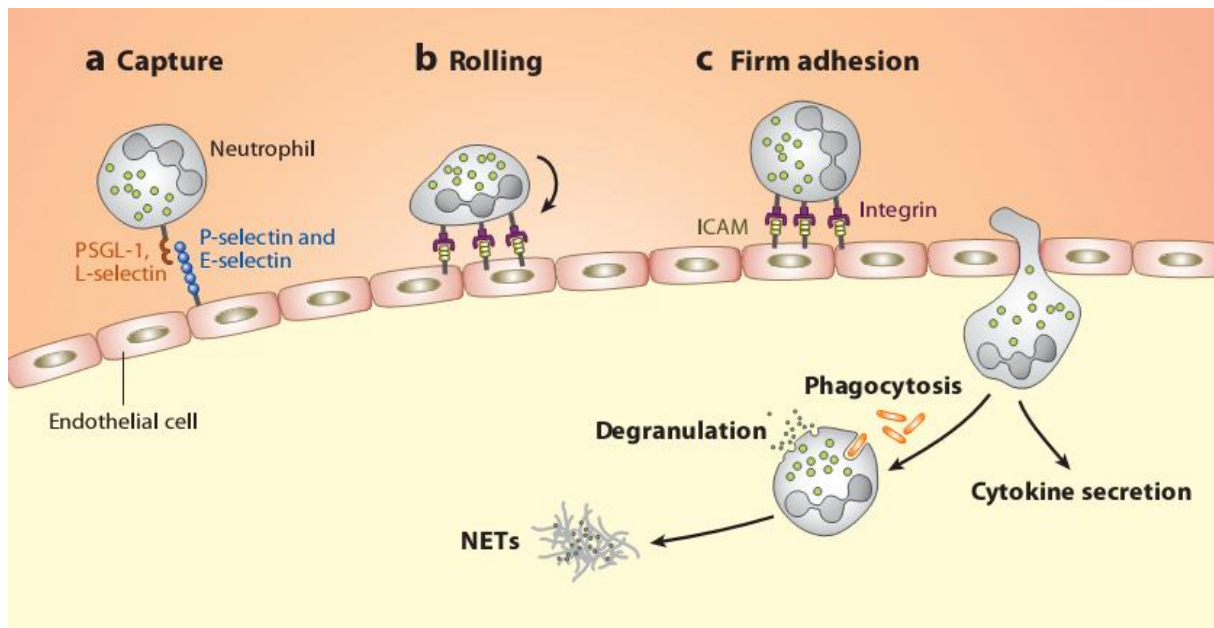


Figure 7 : Modèle des étapes du recrutement des neutrophiles au site inflammatoire (Amulic et al., 2012)

a. A proximité du site inflammatoire, les cellules endothéliales stimulées exposent une classe de molécules, les sélectines, qui servent à la capture des neutrophiles circulants grâce aux molécules que ces derniers expriment constitutivement, PSGL-1 et la L-sélectine. **b.** Une phase de "rolling" le long d'un gradient de chimioattractant s'ensuit. **c.** Cela induit une activation des neutrophiles, entraînant un regroupement des $\beta 2$ -intégrines à la surface de ces cellules, qui se lient à l'endothélium grâce aux récepteurs ICAM, entraînant une adhésion ferme des neutrophiles. Par la suite les neutrophiles se déplacent à travers l'endothélium pour arriver au site d'inflammation. Ils sécrètent des cytokines qui permettent le recrutement d'autres cellules de l'immunité d'une part, et d'autre part mettent en œuvre leur programme de microbicidie. Les neutrophiles phagocytent les bactéries, libèrent des molécules antimicrobiennes par dégranulation et produisent des FRO grâce à la NADPH oxydase phagocytaire. Ils peuvent également éliminer les bactéries par un mécanisme de microbicidie extracellulaire, la formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps).

3.1.1.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Concernant *P. aeruginosa* plus précisément, certaines molécules du quorum sensing produites par cette bactérie ont un pouvoir chimioattractant sur les neutrophiles. L'acyl-homosérine lactone 3-oxo-C12-HSL induit le chimiotactisme des neutrophiles et fait probablement partie des mécanismes des neutrophiles permettant de prévenir la formation de biofilm (Kahle et al., 2013; Zimmermann et al., 2006). Le PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), à faible dose, stimule également le chimiotactisme des neutrophiles. Cette molécule étant produite dans la phase précoce de formation du biofilm, il s'agit aussi probablement d'un des mécanismes des neutrophiles permettant leur infiltration pour prévenir la formation du biofilm par *P. aeruginosa* (Hänsch et al., 2014).

Un processus de chimiotactisme efficace est un point critique dans la réponse contre *P. aeruginosa*. Si le récepteur de chimiokine CXCR2 est neutralisé, cela entraîne une augmentation de la mortalité des souris après infection par *P. aeruginosa* (Tsai et al., 2000). Les neutrophiles des patients atteints de mucoviscidose ont une réponse différente à des médiateurs inflammatoires par rapport à des neutrophiles des sujets normaux. Ils mobilisent moins de récepteurs aux opsonines et libèrent moins de L-sélectine. De plus, ils ont une production de cytokines et une réponse chimiotactique altérée (Conese et al., 2003). Ceci favorise probablement la colonisation et la persistance des bactéries telles que *P. aeruginosa*.

Il a été montré récemment que cette bactérie produit une protéase, IMPa (Immunomodulating Metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa*), capable de cliver PSGL-1, limitant ainsi l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et donc leur migration au site inflammatoire (Bardoel et al., 2012).

A retenir :

- Les neutrophiles migrent au site d'inflammation grâce à un gradient de molécules chimioattractantes issues des bactéries ou produites par l'hôte
- Suite à une première phase de capture, puis de "rolling", les neutrophiles adhèrent fermement à l'endothélium puis migrent au travers de ce dernier
- Des molécules du quorum sensing de *P. aeruginosa* peuvent avoir un pouvoir chimioattractant
- *P. aeruginosa* peut limiter l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et donc limiter la migration des neutrophiles

3.1.2 La phagocytose

3.1.2.1 Description générale

La phagocytose se compose de plusieurs étapes : la reconnaissance, l'ingestion, la digestion puis le rejet. Les phagocytes peuvent reconnaître les bactéries opsonisées (par les protéines du complément, les lectines liant le mannose, les immunoglobulines, etc.) mais aussi les bactéries non-opsonisées. La phagocytose de bactéries non-opsonisées est un mécanisme crucial pour contrôler l'infection lors de la phase précoce (Lovewell et al., 2014a).

Grâce aux TLR et aux récepteurs des opsonines tels que les FcγR, les récepteurs du complément ou des lectines, les phagocytes reconnaissent le pathogène et cela permet l'adhérence des microorganismes à ces cellules. Cela conduit à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui convertit les lipides de la membrane de la cellule hôte PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate). Le PIP3

est un ligand permettant le recrutement de la protéine kinase B (PKB ou Akt) à partir du cytoplasme, entraînant le remodelage de l'actine pour la phagocytose des pathogènes (**Figure 8**) (Enomoto et al., 2005; Lovewell et al., 2014a; Qian et al., 2004). L'activation de PI3K est un mécanisme clé dans la phagocytose de *P. aeruginosa* par les neutrophiles et les macrophages (Hubbard et al., 2011; Wrann et al., 2007). De plus, l'activation de la voie Akt est proportionnelle à la motilité flagellaire de *P. aeruginosa* (Lovewell et al., 2014b). Suite à cette activation, les phagocytes englobent les bactéries pour former le phagosome ou vacuole phagocytaire.

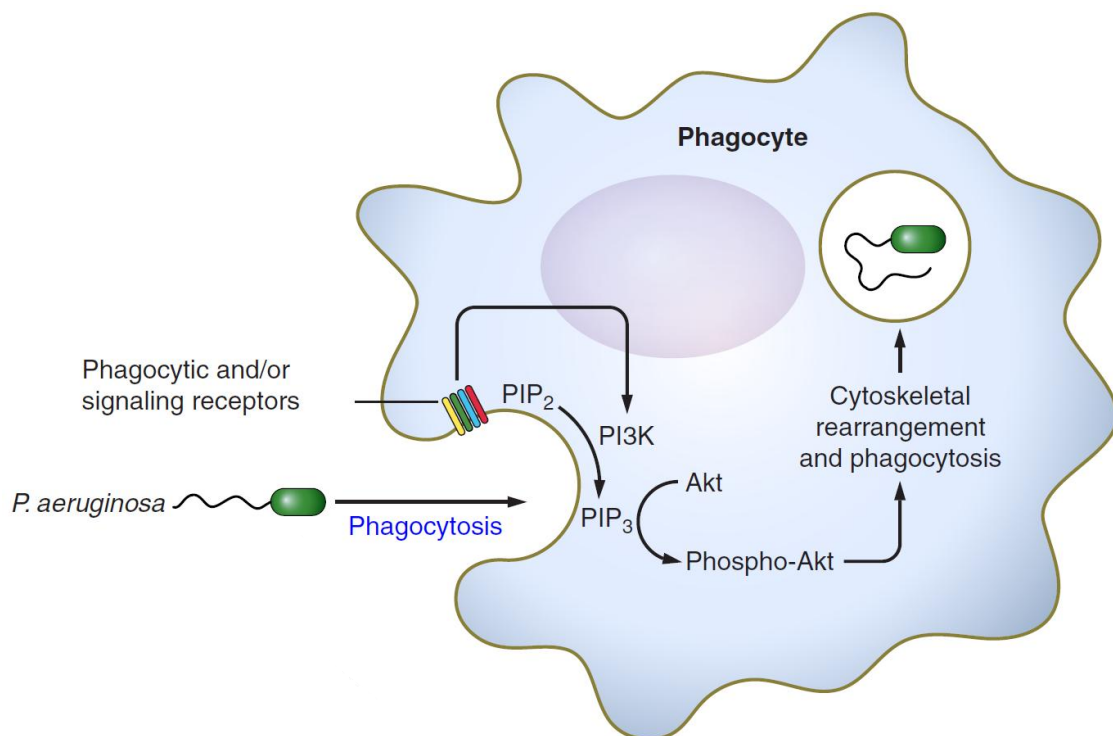


Figure 8 : Modèle de la voie d'activation de la phagocytose de *P. aeruginosa* (Lovewell et al., 2014a)

La reconnaissance de *P. aeruginosa* par un phagocyte conduit à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui converti les lipides de la membrane de la cellule hôte PIP₂ (phosphatidylinositol biphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol triphosphate). Le PIP₃ est un ligand permettant le recrutement de la protéine kinase B (PKB ou Akt) à partir du cytoplasme, entraînant le remodelage de l'actine pour la phagocytose des pathogènes.

3.1.2.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Pour se protéger du processus de phagocytose, *P. aeruginosa* modifie ses marqueurs de surface qui se lient aux TLR et produit des enzymes permettant le clivage ou l'inactivation

des molécules permettant l'opsonisation des bactéries, comme cela a été décrit précédemment. Le biofilm protège également les bactéries de la reconnaissance par les cellules phagocytaires. De plus, il a été montré que la production d'alginate par les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* empêche la phagocytose des bactéries opsonisées et non opsonisées (Eftekhar and Speert, 1988; Lovewell et al., 2014a). Via le Psl, un polysaccharide extracellulaire produit par les souches non-mucoïdes, *P. aeruginosa* limite l'opsonisation par les fragments du complément C3, C5 et C7, limitant ainsi la phagocytose et la réponse oxydative des neutrophiles (Mishra et al., 2012). Ces mécanismes permettent d'échapper à l'adhérence aux phagocytes et donc à la phagocytose. Concernant la reconnaissance des bactéries non-opsonisées, il a été mis en avant il y a longtemps qu'elle était due au flagelle (Mahenthiralingam and Speert, 1995). Il semblerait qu'en réalité ce soit la mobilité liée au flagelle et non le flagelle lui-même qui permette la phagocytose des bactéries non opsonisées. La perte de mobilité des bactéries, comme cela est souvent observé dans les isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose, est donc un mécanisme important dans la persistance de *P. aeruginosa* (Amiel et al., 2010). Les toxines injectées dans les cellules cibles via le SST3 ainsi que les rhamnolipides peuvent inhiber la phagocytose (Engel and Balachandran, 2009; McClure and Schiller, 1996; Mustafi et al., 2013). Par ailleurs, l'élastase de *P. aeruginosa* peut cliver le récepteur PAR2 (Protease-Activated Receptors) (Dulon et al., 2005) qui a un rôle important dans la phagocytose par les neutrophiles (Lovewell et al., 2014a; Moraes et al., 2008), représentant un autre mécanisme d'échappement potentiel.

A retenir :

- Les phagocytes reconnaissent les bactéries opsonisées et non-opsonisées
- Les phagocytes englobent le pathogène pour former le phagosome, qui fusionne avec les granules cytoplasmiques pour former le phagolysosome, permettant la digestion du pathogène
- *P. aeruginosa* possède plusieurs mécanismes pour échapper à la reconnaissance par les phagocytes et peut également inhiber le processus de phagocytose

3.1.3 La dégranulation

3.1.3.1 Description générale

(pour revue voir Amulic et al., 2012)

Les granules des neutrophiles sont formées dès le début de la différenciation, à l'étape promyélocytaire, et tout au long de la différenciation en neutrophiles. Il existe quatre

compartiments granulaires, qui se distinguent par leur contenu protéique et enzymatique et leur apparition lors de la différenciation (**Figure 9**) : les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques, les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires.

Les granules azurophiles ou primaires sont riches en myéloperoxydase (MPO) et contiennent également de la défensine, du lysozyme, de la BPI (Bactericidal/Permeability-Increasing protein) et des sérines-protéases comme l'élastase et la cathépsine G.

Les granules spécifiques ou secondaires sont caractérisées par la présence de lactoferrine et contiennent également d'autres composés antimicrobiens comme le lysozyme, le NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin), le cytochrome *b558*, et la collagénase.

Les granules tertiaires contiennent surtout des metalloprotéases comme la gélatinase, qui facilitent le passage des neutrophiles dans la matrice extracellulaire.

Les vésicules sécrétoires sont un réservoir important de molécules liées à la membrane, qui permettent par exemple le chimiotactisme et l'adhérence des neutrophiles durant la migration.

Les granules secondaires, mais aussi tertiaires et les vésicules sécrétoires sont un important réservoir du cytochrome *b558*, la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire (plus de 80 % de la quantité totale).

Les granules sont mobilisées à différents moments lors de l'activation des neutrophiles. Lorsque les neutrophiles entrent au contact de l'épithélium, les vésicules sécrétoires sont mobilisées, permettant l'adhésion ferme à l'épithélium. Ces vésicules sont riches en facteurs nécessaires à l'activation complète de neutrophiles, tels que la $\beta 2$ intégrine, les récepteurs du complément et du fMLP ainsi que le récepteur Fc γ RIII (CD16). Par la suite, d'autres signaux d'activation vont permettre la mobilisation de la gélatinase et le relargage de metalloprotéases telles que MMP9 (matrix metalloproteinase 9) qui permettent la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire pour faciliter le passage des neutrophiles. Lors de la phagocytose d'un pathogène, les granules primaires et secondaires fusionnent avec le phagosome, pour former le phagolysosome en libérant les molécules microbicides. Cela conduit également à la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) et d'espèces réactives de l'azote (ERA). L'action combinée des FRO, des ERA et des enzymes lytiques permet la dégradation du pathogène, qui est rejeté une fois digéré. Les granules peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et relarguer leur contenu dans le milieu extérieur.

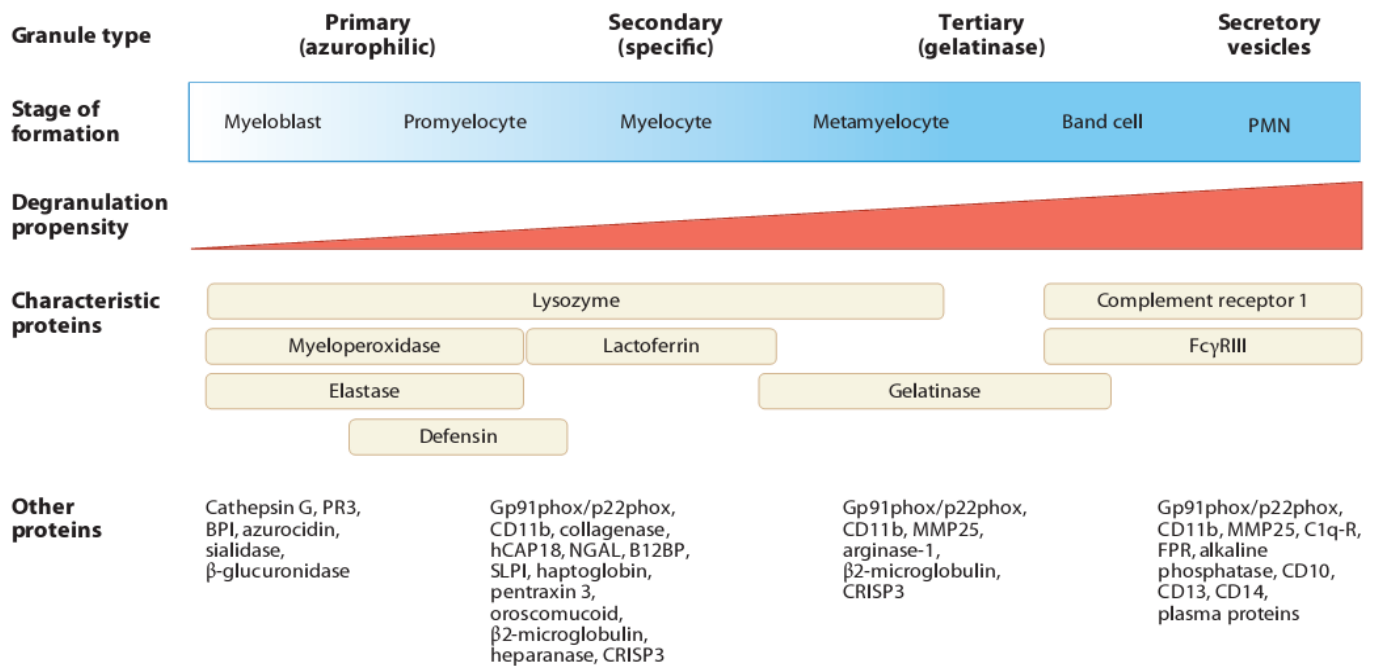


Figure 9 : Caractéristiques des compartiments granulaires des neutrophiles humains (Amulic et al., 2012)

Les granules des neutrophiles sont divisées en quatre sous-types : les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques, les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires. Les différentes granules diffèrent par leur contenu protéique et enzymatique, leur apparition lors de la différenciation ainsi que par leur mobilisation au cours de l'activation des neutrophiles.

3.1.3.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Plusieurs protéines granulaires sont connues pour jouer un rôle clé dans la clairance de *P. aeruginosa*.

La MPO est impliquée dans la clairance des bactéries, en se fixant au pathogène et ayant une action microbicide grâce à la production d'HOCl (Allen and Stephens, 2011). La MPO peut également participer à l'inhibition d'un mécanisme de virulence de *P. aeruginosa*. L'exposition de la pyocyanine à la peroxydase, l'H₂O₂ et le NaNO₂ génère de la pyocyanine mononitratée. Sous cette forme ce métabolite perd son pouvoir antibiotique et n'induit pas de réaction inflammatoire importante, contrairement à la pyocyanine (Reszka et al., 2012), mettant en avant un mécanisme d'inhibition de ce facteur de virulence de *P. aeruginosa*. Par ailleurs, les patients atteints de mucoviscidose, et donc ayant un défaut du canal chlorure permettant de fournir le substrat à la MPO, ont des neutrophiles avec un production intraphagosomale de HOCl déficiente (Painter et al., 2006). Cela entraîne une baisse significative de l'action microbicide des neutrophiles issus de patients atteints de

mucoviscidose comparée aux neutrophiles normaux (Painter et al., 2008). Ceci fait probablement partie des mécanismes expliquant l'échec de la clairance des pathogènes chez ces patients atteints. Comme expliqué précédemment, *P. aeruginosa* produit la protéine Cif qui favorise la dégradation du CFTR par le lysosome, ce mécanisme, en plus d'affecter les cellules épithéliales, pourrait également affecter l'activité MPO des neutrophiles (Ballok and O'Toole, 2013).

L'élastase de neutrophiles (NE) est une sérine-protéase qui cible la porine OprF de *P. aeruginosa*. Cela génère une augmentation de la perméabilité membranaire et donc diminue la croissance et la viabilité de ces bactéries. Les souris NE^{-/-} sont plus susceptibles aux infections à *P. aeruginosa* et une clairance affaiblie a été observée (Hirche et al., 2008). De plus, l'élastase des neutrophiles peut avoir un impact néfaste sur l'hôte en dégradant le CFTR lors d'infection pulmonaire et participe ainsi aux dommages tissulaires, que ce soit chez les patients atteints de mucoviscidose ou les patients souffrant d'infection pulmonaire chronique (Le Gars et al., 2013).

La lactoferrine, un chélateur du fer, a une action à la fois bactéricide et bactériostatique, le fer étant un élément important dans le développement de *P. aeruginosa* (Valenti et al., 2004). De plus, cette protéine prévient également la formation de biofilm par ces bactéries, en stimulant un type de motilité, le "twitching". Cela empêche l'agrégation des bactéries et donc la formation de biofilm (Singh et al., 2002). A nouveau, lors d'une inflammation chronique, des mécanismes délétères pour l'hôte apparaissent. L'élastase des neutrophiles et de *P. aeruginosa* (qui sont des sérines-protéases) et la cathépsine peuvent cliver la lactoferrine, diminuant l'activité antimicrobienne et entraînant une augmentation de la formation de biofilm (Britigan et al., 1993; Rogan et al., 2004).

Le lysozyme, un peptide cationique également présent dans la salive et le liquide de surface des voies aériennes, perturbe la membrane des bactéries par hydrolyse des peptidoglycanes. Des expériences menées sur des souris KO pour le lysozyme ont montré que cette enzyme est nécessaire pour une clairance optimale (Cole et al., 2005). De plus, l'administration par aérosol de lysozyme recombinant humain, dans un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez le hamster, a montré une amélioration des symptômes de pneumonie, avec diminution de la charge bactérienne pulmonaire et du recrutement des leucocytes, en particulier des neutrophiles (Bhavsar et al., 2010).

Le biofilm formé par *P. aeruginosa* permet à ces bactéries de se protéger de ces molécules microbicides (Lyczak et al., 2002).

A retenir :

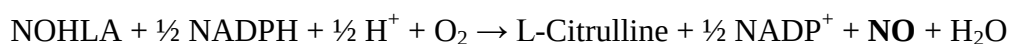
- Les neutrophiles possèdent de nombreuses protéines granulaires pour éliminer les pathogènes
- La myéloperoxydase, l'élastase, la lactoferrine et le lysozyme tiennent un rôle majeur dans la clairance de *P. aeruginosa*
- La myéloperoxydase a un fort pouvoir microbicide et peut participer à l'inhibition de la pyocyanine de *P. aeruginosa*
- L'élastase cible la protéine OprF de *P. aeruginosa* et augmente la perméabilité membranaire, inhibant la croissance et la viabilité des bactéries
- La lactoferrine est un chélateur du fer avec un effet bactéricide et bactériostatique et inhibe la formation de biofilm par *P. aeruginosa*
- Le lysozyme hydrolyse le peptidoglycane de la membrane bactérienne
- La biofilm de *P. aeruginosa* protège ce pathogène de l'action des protéines granulaires

3.1.4 La production des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène

3.1.4.1 Description générale des espèces réactives de l'azote

La production des espèces réactives de l'azote ou ERA est initiée dans les phagocytes par l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase). Cette enzyme est exprimée par les neutrophiles, mais surtout par les macrophages. L'expression de l'iNOS, indépendante du calcium contrairement aux NOS des autres types cellulaires, est induite par les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-2, et aussi par les produits microbiens comme le LPS (Fang, 1997). A l'inverse, des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β (Tumor Growth Factor) et l'IL-10 ont un effet inhibiteur (Green et al., 1994). En outre, chez l'Homme, les cellules produisant le plus d'ERA sont les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Les ERA produites par les cellules épithéliales permettent par exemple d'inhiber l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules (Darling and Evans, 2003). D'autre part, les ERA produites par les cellules endothéliales via l'eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase), exprimée de façon constitutive, ont un rôle majeur dans migration transendothéliale des leucocytes et la régulation de la perméabilité vaculaire (Kvietys and Granger, 2012).

Les NOS permettent la production d'oxyde nitrique (NO) via deux réactions de mono-oxygénation :



3.1.4.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

L'importance des ERA dans la réponse contre *P. aeruginosa* a été mise en évidence via l'inhibition de l'iNOS par du dexaméthasone, montrant une diminution de la survie des souris ne pouvant pas produire d'ERA après une infection aiguë (Satoh et al., 2001). Lors d'une infection chronique, la production d'ERA a également un rôle important. Si l'iNOS est inhibée, cela aggrave les dommages pulmonaires. Au contraire, une stimulation de cette enzyme réduit les dommages tissulaires et la réponse pro-inflammatoire (Hopkins et al., 2006). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les expectorations de patients atteints de mucoviscidose contiennent une importante concentration d'arginase. Tout comme l'iNOS, l'arginase a pour substrat la L-arginine, générant une compétition entre ces deux enzymes et pouvant réduire l'activité de l'iNOS. Une corrélation inverse entre les fonctions pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose et la quantité d'arginase dans les expectorations a été observée. A l'inverse, il y a une corrélation positive entre le NO exhalé et les fonctions pulmonaires des patients, montrant l'importance de l'iNOS dans la réponse immunitaire dans le cadre de la mucoviscidose (Grasemann et al., 2005).

3.1.4.3 Description générale des formes réactives de l'oxygène

La production d'espèces réactives de l'oxygène ou FRO est initiée dans les phagocytes, principalement les neutrophiles et dans une moindre mesure les macrophages, par le complexe enzymatique de la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase NOX2. Ce complexe est composé du cytochrome *b₅₅₈* (composé des deux sous unités membranaires, gp91*phox* et p22*phox* (*phox* pour "phagocytic oxidase)), de trois sous unités cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* et d'une petite protéine G, Rac (**Figure 10**). Au repos, les différentes sous unités sont dissociées et le complexe enzymatique est donc inactif. Le cytochrome *b₅₅₈* se situe au niveau des membranes plasmiques ou granulaires, les sous unités cytosoliques sont sous forme d'hétérotrimère dans le cytosol, la protéine Rac est associée à son inhibiteur RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor).

Lors d'une infection, la fixation de particules opsonisées aux récepteurs Fcγ et aux récepteurs du complément aboutit à l'activation de protéines kinases. Plusieurs protéines kinases tiennent un rôle important dans l'activation de ce complexe enzymatique. Lors de la fixation de particules opsonisées à ces récepteurs, cela conduit d'une part à l'activation des

phospholipases PLC, PLD et PLA₂ et d'autre part à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cela entraîne l'activation d'autres kinases telles que les PKC (Protéine Kinase C), p38 MAPK, Akt/PKB, permettant la phosphorylation des sous-unités cytosoliques et l'activation de Rac (Brécard et al., 2013; Chen et al., 2003; Hazan et al., 1997; Meshulam et al., 1988; Yamamori et al., 2002). Les activateurs particuliers comme le zymosan sont souvent utilisés en laboratoire pour mimer les bactéries. Il a été montré que même en l'absence d'opsonisation, le zymosan permet l'activation du complexe NADPH oxydase, via la fixation aux récepteurs TLR2 et Dectine-1. L'activation de PI3K et de tyrosine kinases permet l'activation de Rac2 et, via des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases et des PKC, la phosphorylation de p47*phox* et ainsi l'activation du complexe NADPH oxydase (Makni-Maalej et al., 2013). Un autre activateur couramment utilisé en laboratoire est le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate). Il active directement les PKC, qui est un récepteur des esters de phorbol, induisant donc la phosphorylation des sous-unités du complexe NADPH oxydase, directement ou par l'intermédiaire des MAP kinases (Cox et al., 1985). Suite à la phosphorylation de p47*phox*, p67*phox* et p40*phox*, ces sous unités cytosoliques sont transloquées vers le cytochrome *b*₅₅₈, formant le complexe NADPH oxydase actif. En parallèle, la protéine Rac qui fixe le GTP se libère de son inhibiteur et migre à la membrane pour participer à l'activation. Le complexe formé permet le transfert d'électrons du NADPH cytosolique vers l'oxygène moléculaire via le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et les hèmes présents sur la protéine, générant ainsi le burst oxydatif ou explosion respiratoire (**Figure 10**) (El-Benna et al., 2012; Guichard et al., 2006).

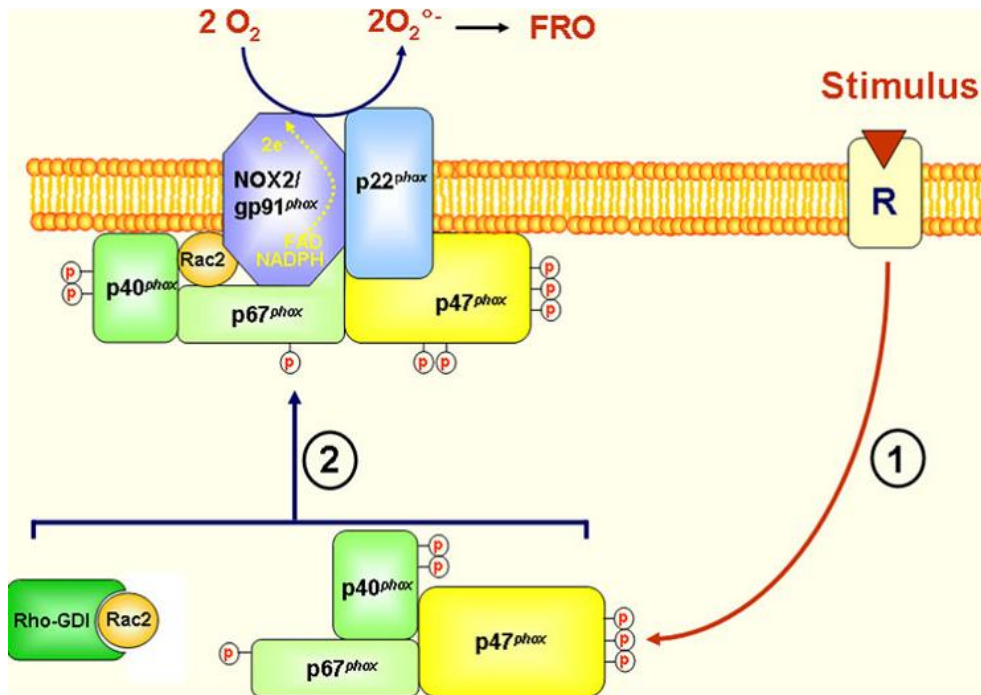


Figure 10 : Modèle d'activation de la NADPH oxydase

(1) Activation par un stimulus du complexe NADPH oxydase des phagocytes entraînant la phosphorylation des sous-unités cytosoliques. (2) Translocation à la membrane des sous-unités cytosoliques phosphorylées et assemblage du complexe de la NADPH oxydase. Le complexe de la NADPH oxydase ainsi formé consomme l'oxygène moléculaire pour former des anions superoxydes qui seront à leur tour convertis en diverses FRO (El-Benna et al., 2012).

La granulomatose septique chronique ou CGD (chronic granulomatous disease) est un syndrome d'immunodéficience héréditaire rare, provenant d'un défaut d'activité de la NADPH oxydase des cellules phagocytaires. Elle se caractérise cliniquement par des infections bactériennes ou fongiques sévères et récidivantes au niveau des tissus superficiels (peau, ganglions) mais aussi profonds (poumons, foie, tractus intestinal, os). Ceci met en avant l'importance de ce mécanisme de microbicidie par les phagocytes (Stasia and Li, 2008). Une étude européenne a montré que les pathogènes les plus courants sont *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp.*, et *Salmonella spp.* Étonnament, *P. aeruginosa* n'est retrouvé que de façon sporadique (van den Berg et al., 2009).

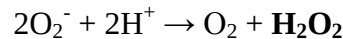
Suite au burst oxydatif, un retour rapide à l'état de repos est nécessaire pour éviter une production excessive de FRO, qui risque de causer des lésions tissulaires, comme c'est le cas chez les patients atteints de mucoviscidose. Bien que les mécanismes de désactivation de la NADPH oxydase soient encore peu connus, plusieurs événements ont été évoqués (Decoursey and Ligeti, 2005). Dans les mécanismes mis en avant, il a été montré qu'une inhibition de la myéloperoxydase (MPO) prolonge l'activité NADPH oxydase. De plus, des mécanismes de

phosphorylation/déphosphorylation spécifiques peuvent permettre un contrôle fin, rapide et réversible, p47phox et Rac semblant être des cibles privilégiées. En effet, p47phox est connu pour être "l'organisateur" ou "l'adaptateur" du complexe NADPH oxydase, facilitant la translocation de p67phox et p40phox à la membrane. Les protéines G comme Rac sont considérées comme des interrupteurs moléculaires dans la transmission des signaux intracellulaires (El-Benna et al., 2009; Kleniewska et al., 2012; Lőrincz et al., 2014). De plus, il a récemment été mis en avant que chez un patient ayant un déficit de la MPO, l'augmentation de la production de FRO est associée à une augmentation de la phosphorylation de p47phox (Hurtado-Nedelec et al., 2013).

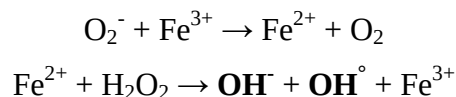
Le complexe NADPH oxydase permet la formation des anions superoxyde via la réaction suivante :



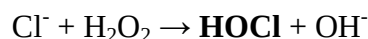
Les anions superoxydes, rapidement formés mais très instables, sont dismutés, spontanément ou par la SOD (superoxyde dismutase), en peroxyde d'hydrogène, qui est relativement stable, passe les membranes et a un pouvoir bactéricide plus élevé que l'O₂⁻ :



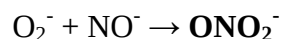
Via la réaction de Fenton, des radicaux hydroxyles (OH) peuvent être formés. Ce sont des composés instables mais avec un fort pouvoir bactéricide :



Le peroxyde d'hydrogène, via la MPO des neutrophiles, est converti en acide hypochloreux, qui peut interagir avec les acides aminés des parois bactériennes pour former le chloramide, une molécule possédant un très fort pouvoir bactéricide :



Les anions superoxydes et l'oxyde nitrique, deux composés ayant une demi-vie très courte, peuvent interagir pour former le peroxynitrite, un oxydant puissant :



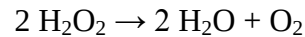
3.1.4.4 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

La production de FRO joue un rôle important dans l'élimination de *P. aeruginosa*. Des expériences réalisées *in vitro*, utilisant des neutrophiles ne produisant pas ou surproduisant des FRO, ont montré que la survie de *P. aeruginosa* est inversement proportionnelle à la quantité de FRO produites (Carrichon et al., 2011). Les souris *p47phox*^{-/-}, ne produisant donc pas de FRO, ont une clairance de *P. aeruginosa* altérée. De plus les souris déficientes pour *p47phox* ne sont pas capables d'activer la voie NF-κB au même niveau que les souris WT, montrant que les FRO sont nécessaires à l'activation optimale de cette voie de signalisation dans le modèle utilisé dans cette étude (Sadikot et al., 2004). Il a également été mis en évidence chez les patients atteints de mucoviscidose que les neutrophiles consomment activement l'oxygène pour produire des FRO et des ERA (Kolpen et al., 2010, 2014).

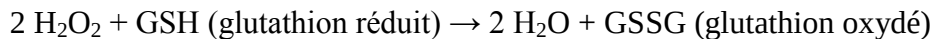
Une étude protéomique a révélé que l'expression d'une soixantaine de protéines est significativement altérée après un traitement de *P. aeruginosa* par du peroxyde d'hydrogène ou du paraquat (un agent générateur de superoxyde) (Hare et al., 2011). Le régulateur transcriptionnel OxyR de *P. aeruginosa* joue un rôle clé dans la régulation positive des mécanismes de défense contre le stress oxydatif, car il stimule l'expression de gènes comme *katB* (catalase), *ahpB* et *ahpCF* (alkyl-hydroxy-péroxydases) lors du contact avec des agents générant un stress oxydant (Vinckx et al., 2008). De plus, via la phospholipase C hémolytique, *P. aeruginosa* inhibe la production d'anions superoxydes par les neutrophiles humains. Le burst oxydatif est plus important lorsqu'une souche bactérienne ne produit pas cette phospholipase et l'ajout de phospholipase C hémolytique dans le milieu, lors de la stimulation par la souche bactérienne déficiente, rabaisse la production d'O₂⁻ au même niveau que lors de la stimulation par la souche WT (Terada et al., 1999). *P. aeruginosa* produit également des quinones oxydoréductases, MdaB and WrbA, qui permettent une meilleure résistance au traitement à l'H₂O₂ (Green et al., 2014). Certaines souches expriment une flavodoxine à longue chaîne qui les protègent contre le stress oxydatif, contribuant par exemple à une meilleur survie lors du contact avec des macrophages (Moyano et al., 2014). Qui plus est, *P. aeruginosa* possède deux gènes codant pour des méthionines sulfoxydes réductases, *msrA* et *msrB*, connues pour être impliquées dans la résistance à l'hypochlorite de sodium. Ces gènes semblent aussi impliqués dans la résistance à l'H₂O₂ et au paraquat (Romsang et al., 2013).

L'hôte possède des mécanismes de régulation contre l'excès d'agents oxydants via la catalase et la glutathion peroxydase afin d'éviter les dommages tissulaires lors de la réponse inflammatoire (Trachootham et al., 2008).

La catalase convertit directement le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène :



La glutathion peroxydase se sert du glutathion réduit (un puissant antioxydant) pour convertir le peroxyde d'hydrogène en eau :



P. aeruginosa peut inhiber ces mécanismes de régulation du stress oxydant. La pyocyanine de *P. aeruginosa*, en plus d'inhiber l'expression de la catalase par les cellules épithéliales, peut également inhiber directement cette enzyme. De plus, la pyocyanine peut oxyder le glutathion réduit, participant ainsi au stress oxydant (Cheluvappa et al., 2008; Lau et al., 2004; O'Malley et al., 2004) et donc aux dommages tissulaires causés par les neutrophiles.

A retenir :

- La production d'espèces réactives de l'azote et de l'oxygène tient un rôle majeur dans la clairance de *P. aeruginosa*
- La production d'espèces réactives de l'oxygène doit être finement régulée pour éviter les dommages tissulaires chez l'hôte
- *P. aeruginosa* possède de nombreux mécanismes de résistance au stress oxydant
- *P. aeruginosa* peut induire un stress oxydant chez l'hôte grâce à la pyocyanine

3.1.5 La NETose

3.1.5.1 Description générale

La formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) ou NETose est un mécanisme de microbicidie extracellulaire des neutrophiles. Cela se caractérise par une décondensation de la chromatine et une désintégration des membranes nucléaire et granulaires. L'ADN est libéré dans le milieu extracellulaire ainsi que les protéines granulaires (élastase, MPO, lactoferrine, etc). L'ADN sert de filet pour piéger les microorganismes qui sont tués par les protéines granulaires. Il s'agit d'un programme de mort cellulaire distinct de l'apoptose et de la nécrose (Brinkmann et al., 2004).

La NETose est un phénomène dépendant de la NADPH oxydase. En effet, les neutrophiles des patients atteints de granulomatose septique chronique ou CGD (une maladie héréditaire caractérisée par un déficit en NADPH oxydase) sont incapables de former des NETs (Fuchs et al., 2007).

Certaines études ont également montré que la MPO est impliquée dans la formation de NETs. En l'absence de MPO, après activation au PMA, les neutrophiles sont incapables de former des NETs et l'HOCl exogène parvient à stimuler leur formation (Metzler et al., 2011; Palmer et al., 2012). Cependant, lors de l'activation des neutrophiles par les bactéries, seule la NADPH oxydase est requise, mais pas la MPO (Parker and Winterbourn, 2012; Parker et al., 2012b). Il y a donc probablement plusieurs mécanismes pouvant induire la NETose, selon le stimulus. Il faut noter que même si la MPO n'est pas requise pour la formation de NETs après stimulation par les bactéries, son absence peut jouer un rôle dans l'efficacité de ce mécanisme de microbicidie.

Une étude a montré que l'élastase des neutrophiles est transloquée dans le noyau, permettant la dégradation partielle des histones et par conséquent favorise la décondensation de la chromatine pour la formation de NETs (Papayannopoulos et al., 2010).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la formation de NETs par les neutrophiles n'est pas affectée (Young et al., 2011). Cependant, une NETose trop importante peut entraîner des dommages aux poumons des patients atteints de mucoviscidose (Yoo et al., 2014a).

3.1.5.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Il a été mis en avant que *P. aeruginosa* est capable de développer des phénotypes augmentant sa résistance à la NETose. La majorité d'isolats cliniques de patients (8 sur 9) ont un phénotype résistant, qui est dépendant du phénotype mucoïde (Young et al., 2011). En outre, une autre étude a montré que les isolats tardifs de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose génèrent une NETose moins importante chez les neutrophiles que des isolats précoces. Il y a donc une adaptation de *P. aeruginosa* à ce mécanisme de microbicidie par les neutrophiles, qui leur permet de persister (Yoo et al., 2014b). Plusieurs mécanismes sont envisageables. Comme décrit précédemment, *P. aeruginosa* peut moduler l'expression de molécules de surfaces qui se lient aux TLR et inactiver ou cliver les molécules qui l'opsonisent, réduisant ainsi l'activation des neutrophiles et leur NETose. Par exemple, la SP-D, clivée par *P. aeruginosa* grâce à des sérine-protéases, favorise le trapping de ces

bactéries en se liant à la fois au pathogène et à l'ADN des NETs (Douda et al., 2011). Egalement, *P. aeruginosa* peut relarguer des vésicules de la membrane externe, qui entrent en compétition avec *P. aeruginosa* pour la liaison aux NETs, inhibant ainsi le trapping des bactéries (Shan et al., 2014). De plus, *P. aeruginosa* est capable de produire de l'ADNase pour se servir de l'ADN extracellulaire comme source de carbone, de nitrogène et de phosphate (Mulcahy et al., 2010). Il a été mis en avant pour d'autres pathogènes (les streptocoques de groupe A) que l'ADNase produite par les bactéries peut aider à la destruction des NETs. Il est donc probable que l'ADNase de *P. aeruginosa* puisse avoir le même effet, afin de résister à la NETose (Buchanan et al., 2006).

A retenir :

- La NETose est un mécanisme de microbicide extracellulaire des neutrophiles
- La NETose est dépendante de la NADPH oxydase
- Une NETose trop importante peut entraîner des dommages tissulaires
- Les isolats cliniques de *P. aeruginosa* développent des phénotypes augmentant leur résistance à la NETose

3.2 *P. aeruginosa* et les macrophages

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée issues des monocytes. Ce sont des cellules résidentes, avec une durée de vie longue, servant de sentinelle et vouées à l'élimination de particules étrangères. Les macrophages portent différents noms selon leur localisation dans les organes, par exemple les histiocytes dans les tissus conjonctifs, les cellules de Kupffer dans le foie, les cellules gliales dans le cerveau et les macrophages alvéolaires dans les poumons. Ces cellules ont la capacité de se déplacer via leurs pseudopodes pour phagocyter des microorganismes. Les monocytes/macrophages sont recrutés activement dans les premiers jours après une infection par *P. aeruginosa* (Amano et al., 2004; Johnston et al., 2012). En plus de leur rôle de phagocytes, les macrophages ont un rôle clé dans la modulation de l'immunité, via la sécrétion de cytokines et de chimiokines et leur capacité à présenter l'antigène. De plus, leur capacité à phagocyter les cellules apoptotiques, l'efferocytose, joue un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation.

Cependant, le rôle de ces cellules dans la clairance de *P. aeruginosa* est controversé. Plusieurs études ont été réalisées à l'aide d'un système de déplétion des macrophages alvéolaires par du clodronate disodique encapsulé en liposome. Après instillation par aérosol,

95% des macrophages sont éliminés. En l'absence de ces cellules, après infection par *P. aeruginosa* des souris, un décalage dans le recrutement des neutrophiles a été observé, suivi d'une persistance de ces derniers. Une diminution de la production de MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein), de KC (équivalent de l'IL-8) 8h après l'infection a également été observée, ainsi qu'une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire et une diminution de la survie des souris 5 jours après l'infection (Kooguchi et al., 1998). Une étude similaire a été réalisée chez le rat, montrant également une diminution du recrutement des neutrophiles, ainsi qu'une diminution de la production de TNF- α , de protéine CINC/gro (équivalent de l'IL-8) et de MIP-2 (Hashimoto et al., 1996). Cependant, une autre étude utilisant également le clodronate disodique encapsulé en liposome, mais par voie intra-nasale, permettant la déplétion de 78 à 88% des macrophages alvéolaires, n'a pas montré de différence dans la clairance de *P. aeruginosa* (Cheung et al., 2000). Des études ont également été réalisées en inhibant, *in vitro* ou *in vivo*, la chimiokine responsable du recrutement des macrophages, le MCP-1. *In vitro* l'inhibition grâce à un anticorps spécifique du MCP-1 produit par les cellules épithéliales a mis en avant une réponse oxydative et une phagocytose diminuées chez les macrophages. *In vivo*, chez les souris MCP1^{-/-} une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire a été observée (Kannan et al., 2009). Une autre étude a mis en avant que l'inhibition du MCP-1 entraîne une diminution du nombre de neutrophiles ingérés par les macrophages, une diminution du niveau de HGF-1 (Hepatocyte Growth Factor, favorisant la régénération des cellules épithéliales) et une augmentation des lésions tissulaires (Amano et al., 2004). Les macrophages et leur processus de recrutement semblent donc tenir une place importante dans la réponse immunitaire et dans sa régulation. Cependant, il est difficile de déterminer si leur rôle dans la clairance de *P. aeruginosa* est dû à leurs fonctions de phagocytes, avec un rôle direct dans la clairance, ou à leurs fonctions de modulateurs de l'immunité, grâce au recrutement d'autres types cellulaires et à la sécrétion de cytokines.

Un étude montre qu'il y a une accumulation de macrophages dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, ceci même en l'absence d'infection (Brennan et al., 2009). Ces derniers sont dit "hyper-réactifs". Lorsqu'ils sont exposés à des produits bactériens, tels que du LPS, la réponse inflammatoire est exacerbée comparé à des macrophages de patients sains (augmentation de la production d'iNOS, d'IL-1 β et de MCP-1) et la réponse anti-inflammatoire est affaiblie (diminution de la production d'IL-10) (Hartl et al., 2012). Ceci fait très probablement partie des facteurs favorisant l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose.

En plus de ces phénomènes d'hyper-réactivité, les macrophages ont également des mécanismes de microbicidie qui peuvent être altérés. Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'acidification du phagolysosome des macrophages est déficiente. En effet, le défaut de transport des ions chlorures empêche l'entrée des ions H^+ et donc la diminution du pH du phagolysosome. Ceci empêche une digestion efficace des pathogènes, qui peuvent ainsi survivre même une fois phagocytés (Deriy et al., 2009; Di et al., 2006). De plus, cette déficience de l'acidification du phagolysosome aurait également un impact sur l'activité NADPH oxydase et donc sur la production de FRO (Zhang et al., 2010b). Cependant, une étude contradictoire a mis en avant que les macrophages (dérivés de monocytes ou issus des poumons) ont une réponse oxydative de même intensité chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les personnes saines (Cifani et al., 2013). Egalement, chez les monocytes, contrairement aux neutrophiles, la protéine CFTR est nécessaire pour une expression optimale de récepteur du complément CD11b, qui fait partie de la famille des intégrines, entraînant un défaut de phagocytose par les monocytes/macrophages (Van de Weert-van Leeuwen et al., 2013).

Comme cela a été dit précédemment, pour contrer la réponse des macrophages, *P. aeruginosa* peut induire leur apoptose via le 3-oxo-C12-HSL ou leur oncose par une destruction du cytosquelette via les exotoxines sécrétées par le SST3.

A retenir :

- Les macrophages participent à l'élimination des pathogènes, à la modulation de l'immunité et à la résolution de l'inflammation
- Les macrophages ont un rôle important dans la réponse immunitaire contre *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* peut induire la mort des macrophages (SST3, molécules du QS)

3.2.1 Modulation de l'immunité par les macrophages

Il existe plusieurs types de macrophages, ayant chacun une fonction dans la régulation de l'immunité. Les macrophages dits "activés classiquement" ou M1 sont importants dans la réponse pro-inflammatoire et pour l'élimination des pathogènes. Les macrophages dits "activés alternativement" ou M2 ont différents rôles et ont des fonctions immunomodulatrices, favorisant le remodelage matriciel et la réparation tissulaire.

3.2.1.1 Les macrophages M1

Les macrophages M1 sont induits par une exposition à l'IFN- γ ou au TNF- α et au LPS (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Ils sont connus pour avoir une forte activité antimicrobienne, avec une forte production de FRO, d'ERA et d'enzymes lysosomales. De plus, ils expriment une large gamme de récepteurs pour la reconnaissance des pathogènes, tels que les récepteurs du complément, Fc γ et les TLR. Ils sont caractérisés par leur expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 (permettant la migration dans les organes lymphoïdes) et CCR2 (récepteur de chimiokines de type MCP). Les macrophages M1 ont également la capacité de générer une réponse lymphocytaire T via l'expression du CMH de classe II (permettant l'activation des lymphocytes T CD4 ou T helper/auxiliaires) et l'expression de molécules de costimulation telles que CD86. Les macrophages M1 produisent une large gamme de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18, l'IL-8, avec une faible production d'IL-10, permettant l'orientation de l'immunité vers une réponse Th1 (T helper 1) et Th17. Cela génère une boucle de régulation, l'IL-12 produite par les macrophages favorisant la polarisation des lymphocytes en Th1 et les Th1 produisant de l'IFN- γ favorisant la polarisation en macrophages M1 (**Figure 11**). La production de nombreuses chimiokines, comme l'IL-8, MCP-1, CCL5, MIP-1 α et β , CXCL9, CXCL10 et CXCL11 permet le recrutement d'une grande variété de cellules de l'immunité (neutrophiles, macrophages, lymphocytes, etc.) (Galli et al., 2011; Mantovani et al., 2004).

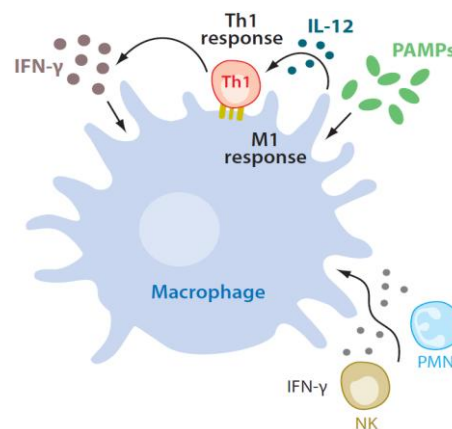


Figure 11 : Modèle des signaux d'activation des macrophages M1 (Martinez et al., 2009)

La polarisation en macrophage M1 est induite par l'IFN- γ , sécrété par des cellules comme les natural killers (NK) ou les neutrophiles (PMN). Les macrophages M1 induisent une réponse Th1. Ces lymphocytes sécrètent de l'IFN- γ , qui favorise la polarisation en macrophages M1.

Lors d'une infection, les monocytes/macrophages sont exposés à du GM-CSF, entraînant une orientation vers un profil M1, puis la polarisation est induite via plusieurs signaux pro-inflammatoires : l'IFN- γ ou le TNF- α et le LPS (Mantovani et al., 2004; Tugal et al., 2013). L'IFN- γ (sécrété entre autre par les Th1) permet l'activation de STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) entraînant l'expression d'iNOS, d'IL-12 et une augmentation de l'expression des TLR et du CMH II. Le LPS, via les TLR, active plusieurs voies de signalisation. La voie NF- κ B permet la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. L'activation du facteur de transcription IRF3 (Interferon Regulatory Factor) permet la production d'interféron de type I, renforçant l'activation de STAT1. L'activation du facteur de transcription IRF5 via les TLR (Takaoka et al., 2005) induit la production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23, tout en réprimant l'expression d'IL-10 (Krausgruber et al., 2011) entraînant de la polarisation des lymphocytes en Th1 (IL-12) et Th17 (IL-23). L'activation d'IRF5 fait partie des marqueurs spécifiques de la polarisation en macrophages M1 (Weiss et al., 2013). La reconnaissance des pathogènes par les NLR (NOD-like receptor) fait également partie des phénomènes participant à l'activation des macrophages M1, menant à la formation de l'inflammasome (dos Santos et al., 2012). Vingt-deux types de NLR ont été identifiés chez l'Homme. La partie C-ter des NLR va médier la détection des agonistes et a un effet auto-inhibiteur. La partie N-ter, qui permet l'interaction protéine/protéine, permet de séparer les NLR en quatre grandes familles : NLRA (domaine de transactivation acide), NLRB (domaine répété inhibiteur des baculovirus), NLRC (domaine CARD (CAspase Recruitment Domain)) et NLRP (domaine pyrine). Il a été montré que *P. aeruginosa* est reconnu par NLRC4 ou IPAF (Interleukin-converting enzyme Protease Activating Factor). L'activation via NLRC4 conduit à l'assemblage d'une plateforme de haut poids moléculaire permettant l'activation de la caspase 1. La caspase 1 permet la maturation protéolytique de l'IL-1 β et de l'IL-18. Les motifs reconnus par NLRC4 sont encore débattus. Ce récepteur reconnaît le SST3 de *P. aeruginosa* (Sutterwala et al., 2007) et plus précisément une protéine du corps basal, PscI. Cette protéine comporte une séquence motif qui semble être reconnue par NLRC4 (Miao et al., 2010). Certains chercheurs ont suggéré que ce récepteur reconnaît également le flagelle de *P. aeruginosa*, mettant en avant la similarité des séquences motifs entre PscI et le flagelle (Miao et al., 2010). Cependant, une autre équipe a récemment montré que c'est la motilité liée au flagelle qui permet l'activation de l'inflammasome et non le flagelle lui-même. En effet la motilité joue un rôle important dans la liaison des bactéries aux macrophages. En cas de perte de motilité il y a également diminution de cette liaison et donc une diminution de la caspase 1 et par conséquent de l'IL-1 β (Patankar et al., 2013). *P. aeruginosa* pourrait donc échapper à

l'immunité en perdant son flagelle, diminuant ainsi l'activation de l'inflammasome. De plus, ExoU, une des toxines sécrétées par le SST3 peut inhiber la production de cytokines liées à la caspase 1 (Sutterwala et al., 2007). Cependant, il a été montré récemment que les souris déficientes pour l'IL-1 β ne sont pas plus sensibles à une souche produisant ExoU que les souris WT. En revanche, les souris déficientes pour l'IL-1 α ont une sensibilité accrue à cette souche. Au contraire, si *P. aeruginosa* ne produit pas ExoU, l'IL-1 α n'est pas nécessaire pour générer un recrutement efficace des neutrophiles, alors que l'IL-1 β est requise. La redondance de ces deux cytokines permettrait donc à l'hôte de pouvoir répondre à des isolats positifs ou négatifs pour ExoU (Al Moussawi and Kazmierczak, 2014).

Il faut savoir que l'activation de l'inflammasome génère un signal pro-inflammatoire fort qui peut se révéler délétère pour l'hôte (Cohen and Prince, 2013). Chez les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 ou déficiente pour l'IL-18, la réponse inflammatoire est diminuée ainsi que le recrutement des neutrophiles, entraînant paradoxalement une meilleure clairance de *P. aeruginosa* et surtout une diminution des dommages tissulaires après une infection aiguë (Schultz et al., 2002, 2003). De façon similaire, les souris NLRC4^{-/-} éliminent plus facilement *P. aeruginosa* et les dommages tissulaires causés par l'infection aiguë sont diminués. Par ailleurs, il a été montré que l'IL-18, fortement induite par le SSTT de *P. aeruginosa*, agit négativement sur l'immunité en réprimant l'IL-17 et l'expression de peptides antimicrobiens liés à l'IL-17 (Faure et al., 2014). Cependant, il est risqué de cibler l'inflammasome pour limiter l'inflammation, car dans un modèle d'infection chronique, la délétion du récepteur de l'IL-1 entraîne une diminution de la clairance de *P. aeruginosa* et un défaut d'activation de la voie NF- κ B (Reiniger et al., 2007). En outre, le récepteur cytosolique NLRC4 joue un rôle critique dans la clairance de *P. aeruginosa* lors de l'infection intracellulaire du pathogène (Faure et al., 2014).

A retenir :

- Les macrophages M1 ont une forte activité antimicrobienne, induisent une réponse pro-inflammatoire et induisent une réponse Th1 et Th17
- L'inflammasome est activé dans les macrophages M1 et peut entraîner une hyper-inflammation délétère pour l'hôte
- Le GM-CSF puis l'IFN- γ ou le TNF- α et le LPS induisent une polarisation en macrophage M1
- L'infection par *P. aeruginosa* induit une polarisation en macrophage M1

3.2.1.2 Les macrophages M2

L'orientation en macrophage M2 est induite par le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), puis les différents signaux perçus par la suite permettent la polarisation en M2a, M2b ou M2c. Tous les macrophages M2 sont caractérisés par une forte production d'IL-10 et une faible production d'IL-12, à l'inverse des macrophages M1.

Les macrophages M2a, dits "pro-fibrotiques", ont un rôle dans la réponse Th2, la défense contre les parasites et l'allergie, et sont induits par l'IL-4 et l'IL-13 (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Ils expriment des récepteurs des lectines tels que le récepteur du mannose (CD206) et Dectine 1 et des récepteurs "scavenger" permettant l'élimination de nombreuses substances étrangères et des déchets. Le récepteur FcεRII (CD23) permet la résistance aux parasites et est également impliqué dans l'allergie. Ils ont aussi la capacité de présenter l'antigène via le CMH II et peuvent être recrutés grâce aux récepteurs de chimiokines CXCR1 et CXCR2. Les macrophages M2a peuvent interférer avec la réponse inflammatoire médiée par l'IL-1 grâce aux récepteurs IL-1ra (receptor agonist) et decoy IL-1RII. Ils produisent une grande variété de chimiokines, comme CCL22 pour le recrutement des Th2 et des T régulateurs (Treg), CCL24 pour le recrutement des Th2, des basophiles et des éosinophiles, CCL18 pour le recrutement des cellules T naïves, qui au contact de l'IL-10 une fois recrutées peuvent devenir tolérantes. La sécrétion de CCL13/MCP4, CCL18/MCP2 et CCL26/eotaxine3 permet la coordination du recrutement des éosinophiles, des basophiles et des Th2. De plus, via la liaison de ces chimiokines au récepteur CCR3, ces dernières peuvent avoir un effet pro-angiogénique (Ahmad et al., 2011; Szekanecz and Koch, 2001). Les M2a peuvent également réguler l'inflammation via l'arginase 1. La compétition pour le substrat, la L-arginine, avec l'iNOS permet de diminuer l'activité microbicide. De plus, cette enzyme permet la production de polyamines et de proline qui stimulent la croissance cellulaire, la formation de collagène et la réparation des tissus (Hesse et al., 2001; Modolell et al., 1995). Dans leur rôle pro-fibrotique et de réparation des tissus, les macrophages M2a produisent de la fibronectine-1, Fizz1 (Found in Inflammatory Zone 1 ou resistin-like molecule α), du facteur de coagulation XIII, de l'IGF-1 (Insulin Growth Factor) et des métalloprotéinases matricielles comme la MMP1 et la MMP12 (Chizzolini et al., 2000; Gratchev et al., 2001; Töröcsik et al., 2005). La production de FGF2 (Fibroblast Growth Factor) a un rôle pro-angiogénique (Jetten et al., 2014). La production d'IL-10 par les M2a permet un maintien de

la polarisation des lymphocytes en Th2 en inhibant les Th1. Les Th2, producteurs d'IL-4 et d'IL-13 permettent de stabiliser la polarisation en M2a (**Figure 12**).

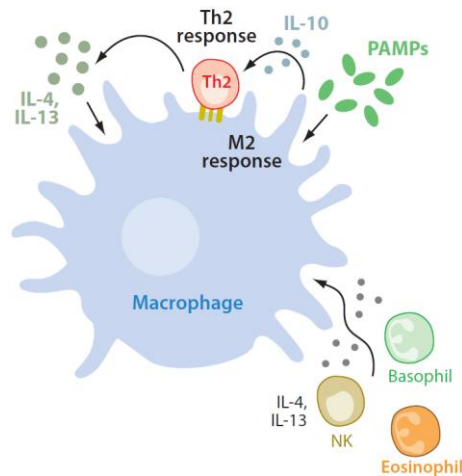


Figure 12 : Modèle des signaux d'activation des macrophages M2a (Martinez et al., 2009)

La polarisation en macrophage M2a est induite par l'IL-4 et l'IL-13, sécrétées par des cellules comme les natural killers (NK), les basophiles et les éosinophiles. Les macrophages M2 induisent une réponse Th2. Ces lymphocytes sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13, qui favorisent la polarisation en macrophages M2a.

Pour la polarisation en M2a, l'IL-4 se lie soit au récepteur hétérodimérique de haute affinité IL-4R α /IL-2R γ , soit au récepteur IL-4R α /IL-13R α 1 auquel l'IL-13 peut également se lier (Mueller et al., 2002). La liaison de ces cytokines à leur récepteur entraîne l'activation de STAT6 (Tugal et al., 2013). STAT6 conduit ensuite l'activation d'IRF4 qui permet la production d'arginase et d'IL-10, entre autre (Satoh et al., 2010). Egalement, STAT6 agit comme inhibiteur de STAT1 et NF- κ B en séquestrant les molécules co-activatrices de ces facteurs de transcription, conduisant à l'inhibition des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, MCP-1, FRO) (Ohmori and Hamilton, 2000). De plus, l'IL-4 permet l'inhibition de la caspase 1 et donc inhibe la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Martinez et al., 2008).

Les macrophages M2b, dit immunorégulateurs, sont impliqués dans l'activation des Th2 et la réponse humorale et sont induits par du LPS ou de l'IL-1 et les complexes immuns (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). En plus de l'IL-10, ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1, favorisant ainsi une réponse Th2. Via la sécrétion de CCL1 (un marqueur caractéristique des M2b) ces macrophages peuvent recruter des lymphocytes Th2 et Treg (Sironi et al., 2006). De plus, ces cellules

expriment le CMH II et les molécules de costimulation (CD86). Tout ceci permet l'amplification de la réponse Th2. Par ailleurs, les M2b produisent de la sphingosine kinase 1, permettant la production de sphingosine 1 phosphate, qui est un médiateur lipidique qui régule la circulation des lymphocytes B et T et l'angiogénèse (Edwards et al., 2006).

La polarisation en macrophage M2b est générée par la stimulation des récepteurs Fc (par les complexes immuns) et la stimulation des TLR (par le LPS) ou du récepteur à l'IL-1 (Anderson and Mosser, 2002; Sutterwala et al., 1998). Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse des M2b n'ont pas encore été identifiés et les mécanismes précis contrôlant l'activation et la modulation de ces macrophages restent à explorer. Cependant, il a déjà été montré que les complexes immuns permettent, via la tyrosine kinase syk (spleen tyrosine kinase), l'inhibition de la signalisation par le TLR4 et de la signalisation via l'interféron de type I en favorisant la production d'IL-10. Parallèlement, le LPS et l'IL-1 induisent MyD88, mais les mécanismes d'interaction avec syk demandent davantage d'études (Biswas and Mantovani, 2010). Egalement, en l'absence de Notch1 une diminution de la polarisation en M2b a été observée, suggérant un rôle important de ce récepteur (Zhang et al., 2010a).

Les macrophages M2c, dit immunosuppresseurs, sont impliqués dans la résolution de l'inflammation, la réparation des tissus et le remodelage de la matrice et sont induits par l'IL-10, le TGF- β ou les glucocorticoïdes (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Comme les macrophages M2a, ils expriment des récepteurs des lectines tels que le récepteur du mannose (CD206) et des récepteurs "scavenger" permettant l'élimination de nombreuses substances étrangères et des déchets. A l'inverse ils expriment faiblement le CMH II, mais expriment le marqueur CD150 ou SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) qui leur permet d'activer les lymphocytes. Les macrophages M2c peuvent interférer avec la réponse inflammatoire médiée par l'IL-1 grâce aux récepteurs IL-1ra et également inhiber le recrutement des macrophages via le récepteur CCR2, fortement exprimé, qui agirait comme "scavenger" des chimiokines de type MCP (Perrier et al., 2004). Les chimiokines sécrétées CCL16, CCL18 et CXCL13 permettent le recrutement, entre autre, des lymphocytes. En présence de l'IL-10 et du TGF- β sécrétés par les macrophages M2c, une tolérance des lymphocytes peut être induite et donc une immunorégulation. Parallèlement, l'inhibition de la réponse inflammatoire se fait également via des inhibiteurs de protéases, comme l' α -antitrypsine qui permet l'inhibition de l'élastase des neutrophiles, inhibant ainsi la rupture de la barrière épithéliale et permettant de limiter l'invasion des cellules épithéliales par *P. aeruginosa* (Pott et al., 2013). De plus, la Pentraxine 3 permet de réguler la clairance des

cellules apoptotiques (Rovere et al., 2000) et le récepteur de la vitronectine aide à la phagocytose de ces cellules (Fadok et al., 1992). Comme les macrophages M2a, les M2c produisent de l'arginase 1, permettant d'inhiber l'iNOS et induisant une réparation tissulaire via la production de polyamines et de proline. Ces macrophages ont aussi une activité pro-angiogénique, médiée par PlGF (Placental Growth Factor) (Jetten et al., 2014).

La polarisation des macrophages M2c (appelés parfois Mreg) peut être induite par trois signaux différents, IL-10, TGF- β ou glucocorticoïdes, qui activent trois voies différentes (Martinez and Gordon, 2014; Martinez et al., 2008). L'IL-10, qui est produite par les macrophages mais aussi par les lymphocytes, fait partie de la réponse homéostatique dans l'infection et l'inflammation. Cette cytokine permet l'activation de STAT3, conduisant à l'inhibition de la voie NF- κ B et donc à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-12. L'IL-10 entraîne également une diminution de l'expression de CMH II et des molécules de costimulation, et, parallèlement, une induction de CD150 ou SLAM, des cytokines anti-inflammatoires et des facteurs favorisant la réparation des tissus (Perrier et al., 2004). Le TGF- β est une cytokine pléiotropique qui régule une grande variété de mécanismes, comme la différenciation ou la prolifération cellulaire. Cette cytokine agit en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 permet une action plus rapide que le TGF- β (Bogdan et al., 1992). Les glucocorticoïdes sont relargués en réponse à une grande variété de stress, tels qu'une infection, et tiennent un rôle important dans l'homéostasie. Le récepteur des glucocorticoïdes se trouve dans le noyau et permet une forte répression des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-6-, IL-8, IL-12, IL-1, etc.) et des médiateurs de l'inflammation comme l'iNOS (Valledor and Ricote, 2004). Parallèlement, la production d'IL-10 et d'autres molécules anti-inflammatoires comme IL-1ra est induite. Dans tous les cas, les facteurs entraînant la polarisation en macrophages M2c permettent une inhibition des cytokines pro-inflammatoires, un renforcement du "scavenging" des débris et des programmes de réparation tissulaire (Martinez et al., 2008).

A retenir :

- L'orientation en macrophages M2 est induite par le M-CSF
- Les macrophages **M2a**, induits par l'IL-4 et l'IL-13, sont dits "pro-fibrotiques" et induisent une réponse Th2
- Les macrophages **M2b**, induits par le LPS ou l'IL-1 et les complexes immuns, sont dits "immunorégulateurs" et favorisent une réponse Th2
- Les macrophages **M2c**, induits par l'IL-10, le TGF- β ou les glucocorticoïdes, sont dits "immunosuppresseurs" et induisent une réponse T régulatrice (Treg)

3.2.1.3 Régulation de la polarisation des macrophages lors d'une infection

3.2.1.3.1 Description générale

Lors d'une infection bactérienne, les macrophages sont polarisés en M1, afin de stimuler la réponse inflammatoire et d'aider à l'élimination des pathogènes. Cela a été montré suite à l'infection par *P. aeruginosa* mais aussi suite à l'infection par d'autres pathogènes, qu'ils soient Gram-négatifs ou Gram-positifs (Benoit et al., 2008; Johnston et al., 2012). Par la suite, les macrophages sont polarisés en M2 pour permettre la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (**Figure 13A**). Lors d'une inflammation chronique, la population de macrophages M1 peut être maintenue, générant un signal pro-inflammatoire persistant. De plus, l'excès et le maintien de la population M2, et en particulier M2a, peut générer un remodelage excessif et potentiellement une fibrose des tissus (Lichtnekert et al., 2013, **Figure 13B**).

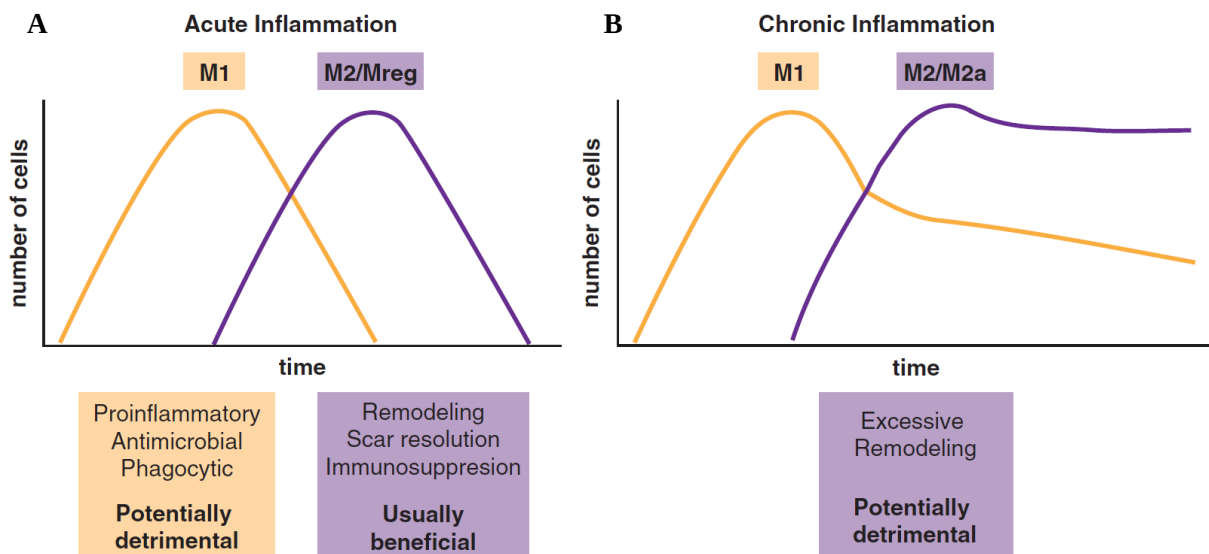


Figure 13 : Modèles de la polarisation des macrophages lors de l'infection aiguë (A) ou chronique (B) (Lichtnekert et al., 2013)

A. Au cours d'une infection, les macrophages M1 permettent une réponse pro-inflammatoire et antimicrobienne, qui peut être délétère à cause des molécules toxiques et des protéases produites. Par la suite, l'émergence d'une polarisation en macrophages M2, et plus particulièrement Mreg ou M2c, permet un remodelage matriciel et une immunosuppression permettant la résolution de l'inflammation.

B. Au cours d'une infection chronique, les macrophages M1 persistent tout comme les macrophages M2, et plus particulièrement M2a. Ceci génère un signal pro-inflammatoire constant et un remodelage matriciel excessif, ce qui est délétère pour l'hôte.

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'orientation des macrophages lors de la réponse inflammatoire.

La première est que les macrophages résidents seraient préférentiellement anti-inflammatoires (M2) et les macrophages recrutés pro-inflammatoires (M1). Le M-CSF, permettant l'orientation des macrophages vers un phénotype M2, est un facteur de croissance homéostatique, circulant en quantité importante dans le sang, suggérant que la polarisation en M2 est la voie de différenciation par défaut (Martinez et al., 2006). A l'inverse, le GM-CSF agit en soi comme un signal pro-inflammatoire en initiant l'activation de la voie NF- κ B et de IRF5 (Krausgruber et al., 2011). De plus, il existe deux types de monocytes. Les monocytes CX3CR1^{hi} CCR2^{low} sont recrutés dans les tissus non-enflammés pour devenir des macrophages résidents et ont une durée de vie longue. Les monocytes CX3CR1^{low} CCR2^{hi} sont recrutés activement au site inflammatoire et ont une durée de vie courte (Geissmann et al., 2010). Ceci suggère que les monocytes, et donc les macrophages, ont un rôle prédéfini selon qu'ils soient résidents ou recrutés.

Cependant, des expériences d'infection aiguë chez la souris par *P. aeruginosa* ont montré que les macrophages ne sont recrutés qu'à partir du deuxième jour environ, contrairement aux neutrophiles qui sont fortement recrutés dès le premier (Amano et al., 2004; Johnston et al., 2012). Malgré cela, dès le premier jour, il a été montré, par RT-PCR, que les macrophages peuvent produire des marqueurs caractéristiques de la polarisation en M1 (TNF- α , IL-6 et iNOS). Par ailleurs, au-delà du deuxième jour (où les macrophages circulants sont activement recrutés), les macrophages produisent des marqueurs spécifiques de la polarisation en M2 (tel que l'arginase 1) et des marqueurs tels que l'IL-10, l'arginase 1 et Fizz1 sont retrouvés jusqu'au 4ème jour de l'infection dans les lavages broncho-alvéolaires (Johnston et al., 2012). Ceci suggère que les macrophages résidents peuvent être pro-inflammatoires et que les macrophages recrutés peuvent avoir des fonctions anti-inflammatoires, suggérant que les macrophages peuvent transiter d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 et l'inverse. Cette hypothèse est confirmée par des expériences qui ont été réalisées *in vitro*. En effet, des macrophages M1 exposés au M-CSF se polarisent en M2, et les macrophages M2 exposés au GM-CSF se polarisent en M1 (Xu et al., 2013). Il a également été montré que des stimuli tels que l'IL-10, l'IL-4, le TGF- β , l'IFN- γ et le TNF- α peuvent modifier les marqueurs de surface et la sécrétion des cytokines par les macrophages issus de monocytes (Porcheray et al., 2005). Les macrophages ont donc une certaine plasticité et leur polarisation est réversible.

3.2.1.3.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Certaines études mettent en avant que les bactéries peuvent influencer la polarisation des macrophages (Benoit et al., 2008). Concernant *P. aeruginosa*, chez les patients atteints de mucoviscidose, les personnes infectées par cette bactérie ont un plus fort pourcentage de cellules exprimant des marqueurs de la polarisation en M2 (récepteur du mannose et arginase). Parallèlement, les cytokines présentes dans les lavages broncho-alvéolaires et les expectorations de patients ont été mesurées, révélant une diminution de l'IL-12, l'IL-8 et l'IL-1, qui sont des marqueurs de la polarisation en M1. Les mécanismes sous-jacents n'ont pas été élucidés, mais les auteurs suggèrent que cela est lié au traitement des patients par un antibiotique, l'azithromycine (Murphy et al., 2010). En effet, les patients infectés par *P. aeruginosa* sont davantage traités par cet antibiotique que les autres. L'azithromycine a un impact sur la polarisation des macrophages *in vitro*, diminuant leur production d'IL-12 et d'IL-6 et favorisant la production d'IL-10. De plus, une augmentation de l'expression du récepteur du mannose et de l'arginase spécifique des M2 a été observé, ainsi qu'une diminution du marqueur CCR7 spécifique des M1 (Murphy et al., 2008). Cependant, il est difficile de déterminer si l'orientation en M2 des macrophages lors de l'infection par *P. aeruginosa* est délétère ou bénéfique, car cela peut aussi bien entraîner un défaut dans la clairance de la bactérie qu'une amélioration de l'inflammation chronique. Par ailleurs, certaines bactéries peuvent directement influencer la polarisation des macrophages, comme *Yersinia enterocolitica*. En effet, des composants du SST3 de cette bactérie, et plus particulièrement des protéines de l'appareil de translocation, ont un effet sur la réponse des macrophages. Les protéines Yop (équivalent fonctionnel des protéines Pop chez *P. aeruginosa*) et LcrV (équivalent fonctionnel de la protéine PcrV chez *P. aeruginosa*) génèrent une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la production d'IL-10, favorisant donc la polarisation des macrophages en M2 (Brubaker, 2003; Hoffmann et al., 2004). Il est possible que *P. aeruginosa* utilise un système similaire afin d'atténuer la réponse de l'hôte.

A retenir :

- Lors d'une infection aiguë les macrophages sont polarisés en M1, puis en M2 pour la résolution de l'inflammation
- Lors d'une infection chronique il y a une persistance des macrophages M1 et M2
- La polarisation des macrophages est réversible
- Certains pathogènes peuvent influencer la polarisation des macrophages pour induire un phénotype M2

3.2.2 L'efferocytose

3.2.2.1 Description générale

L'efferocytose est le mécanisme que permet l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages, mais aussi par les cellules dendritiques immatures et les cellules épithéliales. Il s'agit d'un mécanisme crucial dans l'homéostasie des tissus et la résolution de l'inflammation. Si l'efferocytose est inefficace, cela peut causer des problèmes de développements tissulaires, une auto-immunité, une accumulation des débris toxiques et une inflammation chronique (Henson and Hume, 2006). Si les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées, cela entraîne leur nécrose et la libération de médiateurs pro-inflammatoires. Chez les patients atteints de mucroviscidose, l'efferocytose est déficiente. L'élastase des neutrophiles clive les récepteurs permettant la phagocytose des cellules apoptotiques (Vandivier et al., 2002). De plus, la déficience de la protéine CFTR interfère directement avec l'efferocytose par les cellules épithéliales des voies aériennes (Vandivier et al., 2009). Il s'agit donc d'un des mécanismes responsables de l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose.

L'efferocytose se déroule en plusieurs étapes. Les cellules apoptotiques envoient un premier signal "find-me" en libérant des facteurs diffusibles tels que la lysophosphatidylcholine, la sphingosine-1-phosphate, des nucléotides (comme l'ATP et l'UTP) et la fractalkine ou CX3CL1, induisant le chimiotactisme des macrophages (Elliott et al., 2009; Gude et al., 2008; Lauber et al., 2003; Truman et al., 2008). Il a été suggéré qu'en plus d'attirer les macrophages, ce signal "find-me" permet également la régulation positive des récepteurs de cellules apoptotiques (Ravichandran, 2010). En plus de ce signal, les cellules apoptotiques expriment un signal "eat-me". Le plus connu est l'expression à la surface des cellules de la phosphatidylsérine (PS). La PS est normalement exprimée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, mais lors de l'apoptose elle est exprimée au niveau du feuillet externe, permettant la reconnaissance de ces cellules. Cette reconnaissance peut se faire de façon directe via des récepteurs tels que les membres de la famille TIM (TIM-4 (T cell Immunoglobulin Mucin domain-4) et TIM-1), par le récepteur BAI1 (Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1) ou encore par la stabiline-2 (Kobayashi et al., 2007; Park et al., 2007, 2008). La reconnaissance peut également être indirecte et se faire via des molécules de transition ou "bridge molecule" (Korns et al., 2011). Les opsonines comme C1q, les lectines liant le mannose et les protéines du surfactant permettent la liaison à la calréticuline ou au CD91 des macrophages (Ogden et al., 2001). MFG-E8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8) est

produit par les macrophages et permet la liaison à la PS et aux intégrines $\alpha V\beta 3/5$ (Hanayama et al., 2002). Les protéines telles que Gas6 et la protéine S se lient au récepteur TAM (Tyro/Axl/Mer) des macrophages (Rothlin et al., 2007) et la thrombospondine permet la liaison au récepteur de la vitronectine (Savill et al., 1991).

L'efferocytose a été plus largement étudiée chez les macrophages M2a. En effet, plusieurs mécanismes sont dépendants de PPAR γ et PPAR δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) comme la production des molécules de transition C1q, Gas6, MFG-E8 ou encore la thrombospondine (Korns et al., 2011). Il se trouve que l'IL-4 et l'IL-13 stimulent l'expression et l'activité de PPAR γ et PPAR δ via STAT6 (Kang et al., 2008; Szanto et al., 2010). Ces deux récepteurs nucléaires jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse inflammatoire via l'efferocytose. Les souris déficientes en PPAR γ ont une efferocytose altérée, avec une diminution de récepteurs efferocytiques et une augmentation de l'inflammation (Roszer et al., 2011). Les souris déficientes en PPAR δ souffrent de maladies auto-immunes, avec une diminution de récepteurs efferocytiques et de l'expression des molécules de transition (Mukundan et al., 2009).

Suite à la détection de ces cellules apoptotiques, les macrophages les phagocytent. Le principe est le même que lors de la phagocytose d'un pathogène (reconnaissance, ingestion et digestion) mais cela conduit à des conséquences opposées, avec la production de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF- β et le prostaglandine E2 (PGE2) (Ravichandran, 2010). Cela fait potentiellement partie des mécanismes permettant la transition des macrophages M2a en M2c, grâce à la libération de médiateurs permettant la polarisation en M2c. De plus, la PGE2 entraîne la production d'AMPc (AMP cyclique), qui est connu pour être impliqué dans la transition d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype favorisant la résolution de l'inflammation par les macrophages (Bystrom et al., 2008). En conclusion, l'efferocytose permet de limiter l'inflammation en phagocytant les cellules apoptotiques et favorise la résolution de l'inflammation par la libération de médiateurs anti-inflammatoires.

3.2.2.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

L'alginate produit par les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* peut inhiber le processus d'efferocytose. Les macrophages traités avec de l'alginate purifié ont une efficacité d'efferocytose diminuée, de façon dose-dépendante et temps-dépendant. L'alginate produit par

les souches mucoïdes a le même effet et peut être inhibé partiellement par l'ajout d'alginate lyase qui clive l'alginate (McCaslin et al., 2014).

A retenir :

- L'efferocytose est le mécanisme de phagocytose des cellules apoptotiques
- Les cellules apoptotiques émettent deux signaux, "find-me" et "eat-me", pour être éliminées par les macrophages
- L'efferocytose a principalement été étudiée chez les macrophages M2a
- L'efferocytose génère une réponse anti-inflammatoire via l'induction de la production d'IL-10, de TGF- β et de prostaglandine E2
- L'alginate produit par *P. aeruginosa* peut inhiber l'efferocytose

3.3 *P. aeruginosa* et les cellules dendritiques

3.3.1 Description générale

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles, qui permettent de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lorsque les DC sont immatures, elles ont une capacité élevée à phagocyter et internaliser les pathogènes, elles expriment les TLR et des récepteurs Fc γ et elles ont une faible capacité à présenter l'antigène. L'exposition aux pathogènes, tels que *P. aeruginosa*, et à des cytokines, telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IFN- β entraîne une activation des DC. Cette activation génère une augmentation de l'expression du CMH II, des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 et de la production de cytokines. Le CMH de classe II permet la présentation de l'antigène aux lymphocytes T helper (LT CD4). La production de FRO dans le phagolysosome des DC tient un rôle important dans la présentation de l'antigène (Matsue et al., 2003; Savina et al., 2006). CD80 et CD86 interagissent avec CD28 des cellules T permettant leur activation lors de la présentation de l'antigène. En l'absence de ce second signal, les cellules T deviennent anergiques. CD80 et CD86 peuvent également interagir avec CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein), entraînant une inhibition de la réponse T, vraisemblablement lors de la résolution de l'inflammation, empêchant une réponse immunitaire excessive. Par ailleurs, l'interaction de CD40 avec CD154 (ou CD40 ligand) des lymphocytes permet d'accroître le niveau d'activation des DC, induisant leur maturation terminale et la production de cytokines. La polarisation des lymphocytes T helper en Th1 ou Th2 se fait en fonction des cytokines présentes dans le milieu. Une forte concentration en IL-12 induit une différenciation en Th1 et une faible concentration une différenciation en Th2.

Plusieurs populations de DC ont été mises en évidence. Les DC myéloïdes, issues de monocytes, produisent de l'IL-12 et sont dépendantes du GM-CSF. Elles sont également appelées DC1 car elles induisent une réponse Th1. Les DC lymphoïdes ou plasmocytoïdes, issues d'un progéniteur lymphoïde, produisent peu d'IL-12 et sont dépendantes de l'IL-3 et du G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor). Elles sont également appelées DC2 car elles induisent une réponse Th2. Le G-CSF ne joue donc pas uniquement un rôle dans la différenciation et le recrutement des neutrophiles, mais également dans la mise en place de l'immunité adaptative. Des expériences ont également montré que *P. aeruginosa* active l'inflammasome dans les DC, induisant une production d'IL-1 β et d'IL-18. L'IL-18 induit la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 mémoires non apparentés (Kupz et al., 2012).

3.3.2 Spécificités de l'interaction avec *P. aeruginosa*

Des expériences de vaccination ont montré la capacité des DC à induire une réponse contre *P. aeruginosa*. Des DC issus de moelle osseuse ont été incubées avec *P. aeruginosa* puis injectées aux souris avant infection par cette bactérie, améliorant ainsi leur survie (Worgall et al., 2001). Une expérience similaire a été réalisée grâce à des DC "pulsées" avec la porine OprF de *P. aeruginosa*. Les DC ont été injectées aux souris avant infection par cette bactérie, montrant une résistance à l'infection due à une orientation vers une réponse Th1 (Peluso et al., 2010).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, comme il a été expliqué précédemment, le défaut de production d'IFN de type I, nécessaire à l'activation des DC, peut influencer sur cet aspect de la réponse immunitaire (Parker et al., 2012a). De plus, l'élastase des neutrophiles présent dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose peut inhiber la maturation des DC et leur fonctionnalité en dégradant CD86 et en altérant la capacité des DC à présenter l'antigène (Roghanian et al., 2006). Ces phénomènes peuvent avoir un impact sur la communication entre immunité innée et immunité adaptative orchestrée par les DC et leur rôle dans le développement des maladies pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose reste à élucider (Hartl et al., 2012).

Il a été montré que suite à une infection chronique par *P. aeruginosa* les cellules dendritiques stimulées *ex vivo* par du LPS ont une expression diminuée des facteurs de costimulation (CD80, CD86, CD40), mais pas de la production de cytokines (Mukae et al.,

2010). Comme décrit précédemment, via le SST3, *P. aeruginosa* peut injecter des exotoxines empêchant son internalisation et, dans ce cas, cela peut avoir un impact sur la modulation de la réponse adaptative (Baldwin and Barbieri, 2005). Egalement, certaines molécules du quorum sensing (QS) peuvent impacter la réponse des DC. Le 3-oxo-C12-HSL et le PQS inhibent la production d'IL-12 par les DC après stimulation par du LPS et amoindrissent leur faculté à induire une prolifération des lymphocytes T *in vitro*. Les molécules du QS peuvent donc impacter la maturation des DC, diminuant le profil pro-inflammatoire lié aux Th1 et donc l'activité antibactérienne de l'immunité adaptative (Skindersoe et al., 2009). Le 3-oxo-C12-HSL peut également induire une apoptose des DC (Boontham et al., 2008).

A retenir :

- Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles faisant le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative
- Les cellules dendritiques peuvent induire une réponse contre *P. aeruginosa* lors d'expériences de vaccination
- *P. aeruginosa* peut inhiber la capacité des cellules dendritiques à induire une réponse adaptative et peut induire l'apoptose de ces cellules

3.4 *P. aeruginosa* et les lymphocytes

L'immunité adaptative est caractérisée par une réponse avec un haut degré de spécificité et une réponse dite "mémoire". Les lymphocytes reconnaissent des antigènes spécifiques d'une espèce ou d'une souche. Cette reconnaissance entraîne une expansion clonale des lymphocytes spécialisés. L'activation de l'immunité adaptative est initiée simultanément ou peu de temps après l'activation de la réponse immunitaire innée, mais avec une certaine inertie (Jensen et al., 2010). L'immunité innée et l'immunité adaptative agissent en synergie, le type de réponse innée influençant la réponse adaptative et l'inverse.

Comme décrit précédemment, l'activation de la réponse T helper se déroule en plusieurs étapes. Les CPA, telles que les macrophages et les DC, présentent l'antigène aux lymphocytes T helper naïfs ou Th0, entraînant la formation de la synapse immunologique lors de l'interaction du CMH II et du TCR (T cell receptor). Il y a ensuite interaction des facteurs de costimulation qui renforcent la synapse immunologique et transmettent des signaux activateurs aux lymphocytes. Les cytokines produites par les CPA permettent ensuite d'orienter vers différents types de réponse : Th1, Th2, Th17 ou Treg. Lors d'une infection il y

a un équilibre entre les différents sous-types de T helper (**Figure 14**) et un déséquilibre peut se révéler délétère (Jensen et al., 2010).

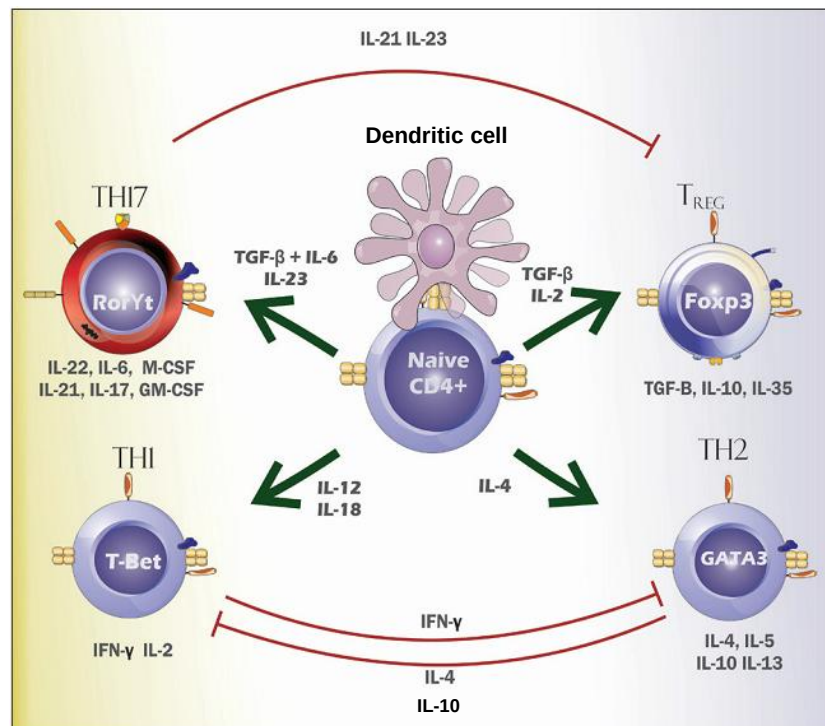


Figure 14 : Différenciation et production de cytokines par les différentes classes de lymphocytes T helper (Souza et al., 2010)

Lors de l'interaction entre cellule présentatrice d'antigène (cellule dendritique ou macrophage) et lymphocyte T helper naïf, les cytokines présentes dans le milieu induisent une différenciation en lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou Treg. Les cytokines produites par les lymphocytes Th1 inhibent la différenciation en lymphocytes Th2 et les cytokines produites par les lymphocytes Th2 inhibent la différenciation en lymphocytes Th1. La différenciation en lymphocyte Th17 inhibe la polarisation en lymphocyte Treg. Les cytokines produites par les lymphocytes Treg inhibent la différenciation en lymphocytes Th1, Th2 et Th17.

3.4.1 Réponses lymphocytaires T helper/auxiliaire

3.4.1.1 Th1

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et sont principalement connus pour leur rôle contre les infections par des pathogènes intracellulaires (bactéries, champignons, virus), mais aussi dans l'auto-immunité (Zhu and Paul, 2008). Leur différenciation est initiée par l'IL-12 lors de la présentation de l'antigène. Via le récepteur IL-12R le facteur de transcription STAT4 est activé, induisant la production d'IFN- γ . Une régulation autocrine via l'IFN- γ conduit à l'activation de T-bet, qui est un facteur de transcription clé dans la différenciation en Th1 et qui est capable d'activer sa propre expression (Kanhare et al., 2012). T-bet inhibe le facteur de transcription GATA3 (GATA

binding protein 3) et la production d'IL-4, caractéristique de la différenciation en Th2 et parallèlement favorise l'expression du récepteur IL-12R et la production d'IFN- γ , permettant le maintien et l'auto-amplification de la différenciation en Th1 et un rétrocontrôle négatif de la différenciation en Th2. L'IL-18 peut également agir en synergie avec l'IL-12 pour induire la différenciation en Th1 et la production d'IFN- γ (Zhu and Paul, 2008).

Les Th1 sont caractérisés par leur production d'IFN- γ , d'IL-2 et de lymphotoxine- α . L'IFN- γ joue un rôle crucial dans l'activation des fonctions phagocytaires des macrophages. Comme mentionné précédemment, l'IFN- γ permet une polarisation en M1 pro-inflammatoires (Martinez et al., 2009). La lymphotoxine- α entraîne la modification des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire et favorise la fixation et donc la migration des cellules phagocytaires comme les macrophages (Suna et al., 2009). L'IL-2 a un rôle important dans l'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoire (Williams et al., 2006). Les Th1 expriment les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR5 (Bonecchi et al., 1998).

3.4.1.2 Th2

Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale et sont surtout connus pour leur rôle dans la protection contre les parasites extracellulaires, mais aussi dans l'allergie et l'asthme (Zhu and Paul, 2008). Leur différenciation est sous le contrôle de l'IL-4 et de l'IL-2. L'IL-4 exogène permet l'activation de GATA3. En l'absence d'IL-4 exogène, l'activation du TCR entraîne l'activation de GATA3 et la production d'IL-4 endogène. L'IL-4 permet l'activation de STAT6 et l'IL-2 l'activation de STAT5. GATA3 permet l'inhibition de T-bet et STAT4 et inhibe donc la production de cytokines de type Th1. STAT6 induit la production d'IL-4, IL-13 et IL-5 caractéristique des Th2. STAT5 favorise la production d'IL-4 et inhibe T-bet.

Les Th2 sont caractérisés par la production d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-25. Ceci permet lors de l'interaction des Th2 avec les lymphocytes B l'induction de la prolifération des lymphocytes B et une augmentation de la production d'anticorps (Dustin, 2014; Zhu and Paul, 2008). Comme mentionné précédemment, l'IL-4 et l'IL-13 induisent la polarisation des macrophages en M2a et ainsi participent aussi indirectement au maintien de la réponse Th2 (Martinez et al., 2009). L'IL-10 permet d'inhiber la prolifération des Th1. L'IL-5 et l'IL-25 sont connus pour être impliqués dans le recrutement des éosinophiles (Coffman et

al., 1989; Zhu and Paul, 2008). Les Th2 expriment les récepteurs de chimiokines CCR3 et CCR4 et CCR8 (Bonecchi et al., 1998; D'Ambrosio et al., 1998).

3.4.1.3 Th17

Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans l'immunité contre les bactéries et les champignons extracellulaires et permettent de faire le lien entre immunité adaptative et immunité innée, leurs cellules effectrices étant les neutrophiles (Stockinger et al., 2007; Weaver et al., 2006). Leur différenciation est initiée par le TGF- β et l'IL-6 qui permettent le recrutement de STAT3. Ceci entraîne l'induction de la production d'IL-17, d'IL-21, l'expression du récepteur IL-23R et du facteur de transcription clé dans la différenciation des Th17, ROR γ (RAR-related Orphan Receptor) (Zhu and Paul, 2008). L'IL-6 et l'IL-1 β peuvent également induire la différenciation en Th17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007a). L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 induisent STAT3 et permettent une différenciation complète et la production d'IL-17 par les Th17. L'IL-6 initie la différenciation en Th17, l'IL21 l'amplifie et l'IL-23 la stabilise. L'IFN- γ et l'IL-4 régulent négativement la production d'IL-17 (McAleer and Kolls, 2011).

Les Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17 (deux isoformes IL-17A et IL-17F), d'IL-21 et d'IL-22, participant ainsi à la réponse pro-inflammatoire. L'IL-17 agit sur les cellules non-immunes, telles que les cellules épithéliales, pour renforcer l'immunité innée. Ceci permet l'induction de peptides antimicrobiens, de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 (Tsai et al., 2013). Comme mentionné précédemment, l'IL-17 agit également sur les cellules endothéliales pour induire l'expression de molécules d'adhésion et, en synergie avec le TNF- α , favorise la production de chimiokines, facilitant le recrutement des neutrophiles (Griffin et al., 2012). Il a également été mis en évidence que les Th17 peuvent promouvoir la réponse Th1, l'IL-17 induisant la production d'IL-12 par les DC (Umemura et al., 2007). Les macrophages stimulés par l'IL-17 produisent également davantage d'IL-12 mais aussi d'IFN- γ de CCL20 et de MMP12 et ont une activité bactéricide accrue (McAleer and Kolls, 2014). L'IL-22 agit sur l'épithélium pulmonaire en induisant la production de peptides anti-microbiens comme l' α -défensine, et induit la production de chimioattractants des neutrophiles. De plus l'IL-22 favorise la prolifération des cellules épithéliales et la réparation suite à une lésion (McAleer and Kolls, 2014; Ye et al., 2001). L'IL-17 et l'IL-22 peuvent également agir en synergie pour stimuler la production d'IL-6 et de G-CSF. D'autres types

cellulaires produisent ces deux cytokines, comme les cellules lymphoïdes innées (ILC). Une infection par *Candida albicans* induit un "priming" de la réponse immunitaire et, entre autre, la production d'IL-22 par les ILC. Ce "priming" permet une meilleure survie des souris, de façon dépendante de l'IL-22, lorsqu'elles sont pas la suite infectées par *P. aeruginosa* (Mear et al., 2013). Par ailleurs, l'IL-21 permet l'autoamplification de la réponse Th17 (Zhu and Paul, 2008). Les Th17 expriment les récepteurs de chimiokines CCR6 et CCR4 (Acosta-Rodriguez et al., 2007b).

3.4.1.4 Treg

Les Treg sont impliqués dans la tolérance du soi et la modulation de la réponse immune (Zhu and Paul, 2008). Ici, seule la différenciation des Treg induits sera abordée. Leur différenciation est médiée par le TGF- β , qui induit l'expression de Foxp3. Le maintien de l'expression de Foxp3 est critique pour l'activité suppressive des Treg, sans cela les Treg sont convertis en Th2-like. Egalement la présence d'IL-6, qui est requise pour la différenciation en Th17 en plus du TGF- β , supprime l'activation de Foxp3. C'est d'ailleurs la seule cytokine pro-inflammatoire à avoir cet effet (Bettelli et al., 2006). L'IL-2, lors de la différenciation en Treg, permet l'activation de STAT5 qui se lie au promoteur de Foxp3, favorisant le développement en Treg. Les TGF- β et l'IL-2 sont tous les deux requis pour la survie et la fonctionnalité des Treg, même après leur différenciation (Zhu and Paul, 2008).

Les Treg sont caractérisés par la production de TGF- β , d'IL-10 et d'IL-35, qui sont des cytokines immunosuppressives. Cela permet l'induction des cellules T helper en Treg et l'inhibition de la prolifération des cellules T. De manière générale, comme décrit précédemment, ces cytokines permettent une inhibition de la réponse immunitaire (Collison et al., 2007; Zhu and Paul, 2008).

A retenir :

- L'immunité adaptative influence la réponse de l'immunité innée et l'inverse
- Les Th1 sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et dans la polarisation en macrophage M1
- Les Th2 sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale et dans la polarisation en macrophage M2a
- Les Th1 inhibent la différenciation en Th2 et l'inverse
- Les Th17 font le lien entre l'immunité adaptative et l'immunité innée en induisant le recrutement des neutrophiles et en favorisant l'efficacité de la réponse innée
- Les Th17 favorisent la différenciation en Th1
- L'IFN- γ et l'IL-4 inhibent la production d'IL-17
- Les Treg sont impliqués dans la tolérance, la modulation de la réponse immunitaire et ont un effet immunosuppresseur
- Les Treg inhibent les réponses T effectrices (Th1, Th2 et Th17)
- La différenciation en Th17 inhibe la différenciation en Treg

3.4.2 Réponse lymphocytaire dans les infections à *P. aeruginosa* et la mucoviscidose

Des études menées chez les patients atteints de mucoviscidose ont mis en avant une corrélation entre les fonctions pulmonaires des patients et l'orientation Th1/Th2, la prédominance d'une réponse Th2 étant associée à un mauvais pronostic dans la cadre d'infections chroniques par *P. aeruginosa* (Moser et al., 2000). D'autres études permettent de faire le même constat, montrant que la prédominance de la réponse Th2 lors de l'infection chronique par *P. aeruginosa* est corrélée à la sévérité des symptômes (Brazova et al., 2005; Hartl et al., 2006; Moser et al., 2005; Tiringier et al., 2013). Par exemple, chez les patients atteints de mucoviscidose, lors d'une infection chronique à *P. aeruginosa* il y a une augmentation des marqueurs de la différenciation en Th2, tels que l'IL-4 et IL-13, et une diminution des marqueurs de la différenciation en Th1, tels que l'IFN- γ et l'IL-2 (Hartl et al., 2006). Une autre étude a mis en avant un changement dans la concentration sérique en G-CSF et en GM-CSF, qui est associée à la réponse Th1/Th2. Le mécanisme de changement de différenciation des T helper pourrait donc être lié à un changement dans le profil des cellules dendritiques. De plus, le ratio GM-CSF/G-CSF est associé à de bonnes fonctions pulmonaires (Moser et al., 2005). Une étude récente traite de l'impact sur la réponse immune de l'ajout d'oligosaccharides acides dérivés de pectine dans l'alimentation. Il y a un accroissement de la différenciation en Th1 et une inhibition de la différenciation en Th2, tout en maintenant une réponse immunitaire innée par le recrutement des neutrophiles et des macrophages, avec une

polarisation M1 des macrophages. Ceci génère une amélioration de la clairance après infection par *P. aeruginosa* (Bernard et al., 2014).

L'effet délétère généré par les Th2 peut être expliqué par le fait que cela entraîne une réponse humorale prononcée chez les patients atteints de mucoviscidose, infectés chroniquement par *P. aeruginosa* (Pressler et al., 2009). Les anticorps peuvent être dirigés contre les facteurs de virulence de la bactérie, comme l'élastase, la β -lactamase, le flagelle, etc., et être bénéfiques. Cependant, cela peut conduire à la formation de complexes immuns qui précipitent dans le parenchyme et entraînent l'activation du complément et l'opsonisation des neutrophiles, causant indirectement des dommages aux poumons. De plus, il existe des auto-anticorps ANCA (AntiNeutrophil Cytoplasmic Autoantibody) dirigés par exemple contre une protéine granulaire des neutrophiles, la BPI (Bactericidal/Permeability-Increasing protein). Une corrélation a été montrée entre les auto-anticorps BPI-ANCA et la sévérité des symptômes, ceci étant dû à l'inhibition de la phagocytose par ces auto-anticorps (Jensen et al., 2010). La réponse Th1 s'avère bénéfique car elle permet l'augmentation du nombre de macrophages et leur activation. Cela favorise la phagocytose des pathogènes, mais surtout des neutrophiles apoptotiques et des débris cellulaires, permettant la résolution de l'inflammation (Ware and Matthay, 2000). La réponse Th1 permet également l'inhibition de la production d'IL-8 par les neutrophiles et réduit donc leur recrutement (Cassatella et al., 1993). Qui plus est, comme il a été expliqué précédemment, la réponse Th1 inhibe la réponse Th2 et donc la production d'anticorps, réduisant la formation de complexes immuns.

Plusieurs études démontrent l'effet protecteur de la réponse Th17 et de l'IL-17 lors d'une infection aiguë par *P. aeruginosa* et du développement de ce pathogène en extracellulaire (Dubin et al., 2012; Faure et al., 2014; Liu et al., 2011; Wu et al., 2012; Xu et al., 2014; Ye et al., 2001). Par exemple, un vaccin stimulant une réponse Th17 contre *P. aeruginosa* a un effet protecteur lors d'une infection (Wu et al., 2012). Il a également été mis en évidence que la production d'IL-17, entre autre par les Th17, protège les souris lors de l'infection aiguë par *P. aeruginosa* (Liu et al., 2011). De plus, l'administration d'IL-17 a un effet protecteur, grâce aux effecteurs en amont, comme l'IL-1 β , MIP-2 et G-CSF, améliorant la clairance bactérienne et la survie (Xu et al., 2014). En l'absence du récepteur IL-17R, cela génère une augmentation de la sensibilité aux infections pulmonaires (Ye et al., 2001). En outre, l'IL-23, qui stabilise la différenciation en Th17, a un rôle important lors de l'infection. En synergie avec l'IL-1 β , l'IL-23 induit le recrutement précoce des neutrophiles, puis par la suite l'induction de l'IL-17 favorise également le recrutement des neutrophiles de façon plus tardive (Dubin et al., 2012). Cependant, un effet délétère des Th17 a été observé lors

d'infections chroniques (Decraene et al., 2010; Iannitti et al., 2013; Tiringer et al., 2013; Tsai et al., 2013). Chez les patients atteints de mucoviscidose, avec une infection chronique à *P. aeruginosa*, des niveaux plus élevés d'IL-17 et d'IL-23 ont été mesurés comparé aux patients non-infectés chroniquement. Cela entraîne la persistance de l'infiltration des neutrophiles dans les poumons, pouvant causer des dommages tissulaires (Decraene et al., 2010). Une corrélation entre la sévérité des symptômes et la présence de cytokines liées au profil Th17 ou Th2 a également été montrée. En outre, la présence de fortes concentrations de ces cytokines, avant infection par *P. aeruginosa*, génère un terrain favorable à l'infection (Tiringer et al., 2013). Un déséquilibre entre la réponse Th17 et la réponse Treg a également été mis en avant dans un modèle de souris atteintes de mucoviscidose, lors d'une infection par *Aspergillus fumigatus*. Une déficience de la voie des kynurénines, qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire, serait à l'origine de ce déséquilibre, générant une forte réponse Th17 et une réponse Treg amoindrie. La réactivation de la voie des kynurénines rétablit cet équilibre (Iannitti et al., 2013). Cependant, une étude réalisée sur le sérum de patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* versus des donneurs sains, n'a pas mis en avant de déséquilibre de la voie des kynurénines (Sadowska-Bartosch et al., 2014).

Le rôle des Treg est moins bien défini lors de l'infection à *P. aeruginosa*. La déplétion des Treg naturels n'a pas d'effet sur la réponse cytokinique, l'infiltration des neutrophiles et les dommages pulmonaires lors d'une infection aiguë à *P. aeruginosa*. Les Treg naturels ne semblent donc pas contribuer à la réponse contre *P. aeruginosa* et à la physiopathologie de l'infection dans ces conditions (Carrigan et al., 2009). Cependant, l'administration d'un probiotique lors de l'infection à *P. aeruginosa* améliore la survie, diminue la charge bactérienne, les marqueurs de l'inflammation et les dommages pulmonaires. Ceci est associé à une augmentation des cellules Treg. Les Treg peuvent donc avoir un rôle protecteur, mais cela reste à étudier de façon plus approfondie (Khailova et al., 2013).

Comme décrit précédemment, *P. aeruginosa* peut interférer avec la différenciation des lymphocytes via son action sur les DC. Mais cette bactérie peut également agir directement sur les T helper. A nouveau, les molécules du QS jouent un rôle majeur. Le 3-oxo-C12-HSL, lors d'une coculture des lymphocytes avec les DC, induit une augmentation de la production d'IL-4 et d'IL-10 et une diminution de la production d'IFN- γ , d'IL-6 et d'IL-2, et aussi une apoptose des lymphocytes T CD4, mais pas CD8 (Boontham et al., 2008). Cette molécule peut également inhiber la différenciation des Th1 et des Th2 et donc la production de cytokines par ces cellules (Ritchie et al., 2005), telles que le TNF- α et l'IL-12 (Chhabra et al.,

2003; Telford et al., 1998). Le 3-oxo-C12-HSL et le C4-HSL inhibent la prolifération des cellules T et entraînent une transition de la réponse protectrice Th1 vers la réponse délétère Th2 via une forte inhibition de l'IFN- γ (Gupta et al., 2011). La pyocyanine peut également avoir un impact délétère sur la réponse lymphocytaire. Après 12 semaines d'exposition un shift de la réponse Th1 vers la réponse Th2 a été observé (Caldwell et al., 2009). Les molécules sécrétées par *P. aeruginosa* semblent donc induire un changement de milieu qui défavorise la réponse Th1 et favorise la réponse Th2 (Jensen et al., 2010). A ce jour, aucune étude ne traite de l'impact de *P. aeruginosa* sur la réponse Th17. Cependant, il ne serait pas surprenant que l'effet anti-prolifératif et l'inhibition de la différenciation par les molécules du QS s'applique également aux Th17.

A retenir :

- Lors d'une infection par *P. aeruginosa*, la réponse Th1 a un rôle protecteur et la réponse Th2 est délétère
- Les réponses Th2 et Th17 sont associées à un mauvais pronostic dans le cadre d'une infection chronique par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose
- La réponse Th17 a un rôle protecteur dans le cadre d'une infection aiguë par *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* peut inhiber la différenciation des lymphocytes
- *P. aeruginosa* peut induire une différenciation des lymphocytes en Th2 et induire un changement de milieu défavorisant la réponse Th1 et favorisant la réponse Th2

4 Récapitulatif des mécanismes de défense de *P. aeruginosa* contre le système immunitaire

Les mécanismes d'échappement au système immunitaire utilisés par *P. aeruginosa* sont résumés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire de *P. aeruginosa*

Systèmes de défense de l'hôte	Mécanismes d'échappement de <i>P. aeruginosa</i>	Références
Détection par le système immunitaire		
Inhibition de la détection par les PRR	Perte du pili et du flagelle Modification du LPS Régulation négative du SST3 Protéine Cif Formation de biofilm	(Amiel et al., 2010; Bomberger et al., 2011; Bragonzi et al., 2009; Cigana et al., 2009; Lyczak et al., 2002)
Inhibition de l'opsonisation	Elastase Protéase IV Protéases alcalines Alginate Polysaccharide (Psl)	(Engel et al., 1998; Heck et al., 1990; Hong and Ghebrehwet, 1992; Laarman et al., 2012; Lovewell et al., 2014a; Malloy et al., 2005; Mariencheck et al., 2003; Mishra et al., 2012)
Les cellules épithéliales		
Induction de la mort cellulaire	Toxines du SST3 Exotoxine A Phospholipase Lectines solubles 3-oxo-C12-HSL	(Bajolet-Laudinat et al., 1994; Boles et al., 2005; Kipnis et al., 2006; Vikström et al., 2006)
Inhibition de la clairance ciliaire	Phénazines Pyocyanine Rhamnolipides	(Lau et al., 2004; Read et al., 1992)
Augmentation de la perméabilité de l'épithélium	Elastase 3-oxo-C12-HSL	(Azghani et al., 2000; Holm and Vikström, 2014)
Inhibition de la signalisation	Phénazines Protéine Cif	(Bomberger et al., 2014; Denning et al., 2003)
Les neutrophiles		
Induction de la mort cellulaire	Toxines du SST3 3-oxo-C12-HSL Pyocyanine Rhamnolipides	(Allen et al., 2005; Dacheux et al., 2000; Jensen et al., 2007; Tateda et al., 2003)
Inhibition du chimiotactisme	IMPα	(Bardoel et al., 2012)
Inhibition de la phagocytose	Toxines du SST3 Elastase Rhamnolipides Phénotype mucoïde	(Engel and Balachandran, 2009; Lovewell et al., 2014a; Mustafi et al., 2013)
Inhibition des FRO	Régulateur transcriptionnel OxyR Catalase Alkyl-hydroxy-péroxydases Phospholipase C Flavodoxine à longue chaîne Méthionine sulfoxyde réductases	(Cheluvappa et al., 2008; Green et al., 2014; Hare et al., 2011; Moyano et al., 2014; Romsang et al., 2013; Terada et al., 1999; Vinckx et al., 2008)
Induction d'un stress oxydant	Pyocyanine	(Cheluvappa et al., 2008; Lau et al., 2004)
Inhibition de la dégranulation	Elastase Biofilm	(Lyczak et al., 2002; Rogan et al., 2004)
Inhibition de la NETose	Phénotype mucoïde ADNase	(Buchanan et al., 2006; Yoo et al., 2014b; Young et al., 2011)
Les macrophages		
Induction de la mort cellulaire	Toxines du SST3 3-oxo-C12-HSL	(Dacheux et al., 2000; Tateda et al., 2003)

Systèmes de défense de l'hôte	Mécanismes d'échappement de <i>P. aeruginosa</i>	Références
Les macrophages		
Inhibition de la microbicidie	Mêmes mécanismes que pour les neutrophiles	
Induction de la polarisation en M2	Non déterminé	(Murphy et al., 2010)
Inhibition de l'efferocytose	Alginate	(McCaslin et al., 2014)
Les cellules dendritiques		
Induction de la mort cellulaire	3-oxo-C12-HSL	(Boontham et al., 2008)
Inhibition de l'internalisation	Toxines du SST3	(Baldwin and Barbieri, 2005)
Modification de la production de cytokines	3-oxo-C12-HSL PQS	(Skindersoe et al., 2009)
Inhibition des facteurs de costimulation	Non déterminé	(Mukae et al., 2010)
Les lymphocytes		
Induction de la mort cellulaire	3-oxo-C12-HSL	(Boontham et al., 2008)
Inhibition de la prolifération	3-oxo-C12-HSL C4-HSL	(Gupta et al., 2011)
Inhibition de la différenciation	3-oxo-C12-HSL	(Ritchie et al., 2005)
Induction de la différenciation en Th2	3-oxo-C12-HSL C4-HSL Pyocyanine	(Boontham et al., 2008; Caldwell et al., 2009; Gupta et al., 2011)

PARTIE III : LA VOIE DES KYNURENINES

La voie des kynurénines est une voie du catabolisme oxydatif du tryptophane, permettant de convertir le L-tryptophane en L-kynurénine grâce à l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) ou la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) et la kynurénine formidase. La L-kynurénine est ensuite convertie en anthranylate ou acide anthranylique par la kynuréninase. Chez les bactéries, ces gènes responsables de la conversion du L-tryptophane en L-kynurénine puis en anthranylate s'appellent respectivement *kynA*, *kynB* et *kynU* (**Figure 15**).

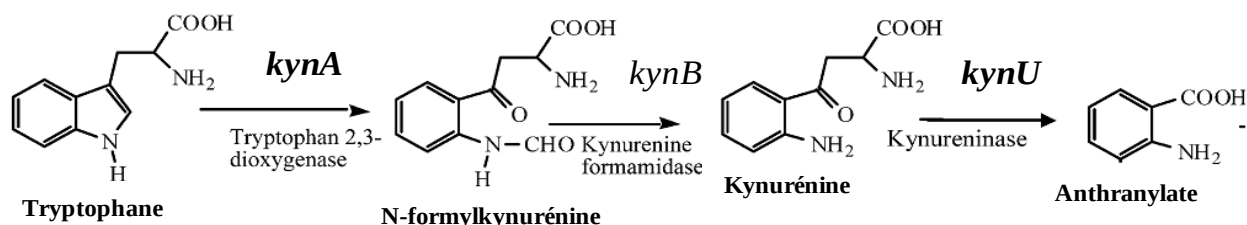


Figure 15 : La voie des kynurénines.

Chez *P. aeruginosa*, les gènes *kynA* et *kynB* codent pour les enzymes permettant la conversion du tryptophane en kynurénine et le gène *kynU* pour l'enzyme permettant la conversion de la kynurénine en anthranylate. Chez l'Homme, c'est l'indoléamine-2,3-dioxygénase ou la tryptophane-2,3-dioxygénase et la kynurénine formidase qui permettent la conversion du tryptophane en kynurénine et la kynuréninase la conversion de la kynurénine en anthranylate.

1 La voie des kynurénines de *P. aeruginosa*

1.1 Le métabolisme de tryptophane de *P. aeruginosa*

Le tryptophane est le précurseur de nombreuses molécules impliquées dans la virulence et l'interaction avec l'hôte (**Figure 16**).

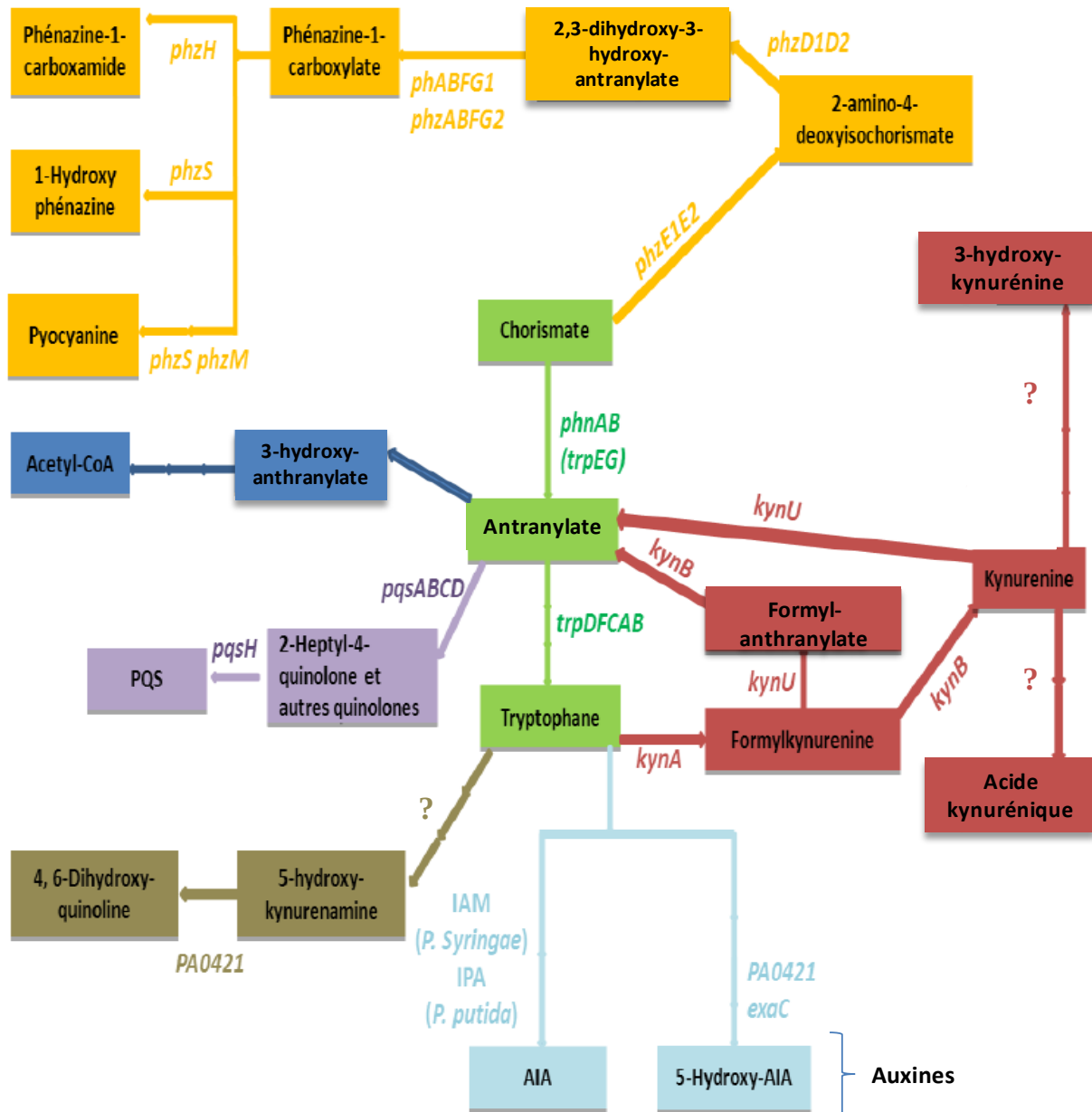


Figure 16 : Le métabolisme du tryptophane chez *Pseudomonas* spp (inspiré de Chaker, 2012).

Le métabolisme du tryptophane permet la formation de nombreuses molécules impliquées dans la virulence et le métabolisme de *P. aeruginosa*, comme les auxines (bleu ciel), le PQS (violet) et la kynurénine (rouge). Deux voies de synthèse permettent la production de PQS, la conversion du chorismate en anthranylate (vert) ou la voie des kynurénines (rouge). Le chorismate sert également de précurseur pour la synthèse des phénazines (jaune). Plusieurs voies putatives du métabolisme de tryptophane restent encore à explorer.

Le tryptophane est le précurseur des auxines, telles que l'acide indole-3-acétique (AIA) et le 5-hydroxy-AIA (Cohen et al., 2003). Les auxines sont des phytohormones possédant un rôle centrale dans de nombreux aspects du développement des plantes (Woodward and Bartel, 2005). Ces molécules sont également produites par les bactéries de la famille des Pseudomonadaceae comme *P. syringae*, *P. putida* et également *P. aeruginosa* (Ayyadurai et al., 2006; Lambrecht et al., 2000; Patten and Glick, 1996). Les auxines servent de signal dans l'interaction plante-microbe en symbiose, protégeant les plantes de certaines maladies (Ayyadurai et al., 2006; Khare and Arora, 2010). Il a également été montré que les auxines, telles que l'AIA, font partie des métabolites impliqués dans un signal, dépendant du tryptophane, inhibant l'expression du SST3. L'AIA pourrait donc avoir un rôle dans la régulation de la virulence des bactéries (Shen et al., 2008).

Une voie putative permettant la production de 5-hydroxy-kynurénamine et de 4,6-dihydroxy-quinoline a également été identifiée (<http://www.pseudomonas.com/>). La 5-hydroxy-kynurénamine est connue, par exemple, pour être un métabolite de la voie de la sérotonine et pour générer une compétition avec la sérotonine, car ces deux métabolites interagissent avec le même récepteur (Okuma et al., 1976; Pomfret et al., 1987).

Le tryptophane est également un précurseur de l'anthranilate. Ce dernier est un précurseur de l'acétyl-CoA, mais surtout du PQS (Knoten et al., 2011). Comme décrit précédemment, le PQS est un des systèmes de quorum sensing de *P. aeruginosa* permettant la régulation d'un grand nombre de gènes et est aussi impliqué dans l'interaction hôte-pathogène (**Tableau 1**). Le PQS est produit lors des infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (Collier et al., 2002) et fait partie des cibles thérapeutiques potentielles (Calfee et al., 2001). L'anthranilate peut être produit par la dégradation du tryptophane par la voie des kynurénines grâce aux enzymes KynA, KynB et KynU. L'autre voie connue pour la production de l'anthranilate est la dégradation du chorismate par les anthranilate synthases TrpEG ou PhnAB (Farrow and Pesci, 2007; Kurnasov et al., 2003; Palmer et al., 2013).

Le chorismate est un métabolite central. Il s'agit du précurseur métabolique commun des acides aminés aromatiques, comme la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane via l'anthranilate. Le chorismate est également le précurseur des phénazines (Palmer et al., 2005), telles que la pyocyanine, qui ont un rôle clé dans la virulence des bactéries et dans l'interaction hôte-pathogène (**Tableau 1**). Le chorismate peut être converti en anthranilate par deux anthranilate synthases, TrpEG et PhnAB. Il a été mis en évidence que le gène *trpEG* est principalement exprimé à faible densité bactérienne, durant la phase précoce de croissance. Ceci fait que TrpEG est principalement impliqué dans la génération de tryptophane via la

production d'anthranylate (Palmer et al., 2013). Au contraire, le gène *phnAB* est principalement exprimé à forte densité bactérienne, durant la phase tardive de croissance. De plus, le gène *phnAB* est coréglulé avec les gènes nécessaires à la biosynthèse du PQS (Déziel et al., 2004). Il en résulte que PhnAB est principalement impliqué dans la production du PQS (Palmer et al., 2013).

Des expériences ont montré qu'un mutant *phnA* de *P. aeruginosa* est capable de lyser *Bacillus subtilis* à hauteur de 70%, comparé à une souche sauvage, grâce au PQS. Au contraire une souche mutante pour le gène *pqsA* (gène impliqué dans la biosynthèse de PQS à partir d'anthranylate) perd sa capacité à lyser *B. subtilis* (Park et al., 2005). Ceci a permis de mettre en avant l'existence d'une autre voie permettant de synthétiser l'anthranylate et donc le PQS. Comme mentionné précédemment, il s'agit de la voie des kynurénines. Plusieurs bactéries possèdent cette voie du métabolisme oxydatif du tryptophane (Kurnasov et al., 2003). KynA, la première enzyme de la voie des kynurénines, est une tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) et plusieurs études biochimiques et structurales ont été menées sur cette enzyme chez l'Homme et chez les bactéries (Capece et al., 2011; Dolusić et al., 2011; Forouhar et al., 2007; Yuasa et al., 2011; Zhang et al., 2007; Zummo et al., 2012). La TDO est décrite comme étant un homotétramère et plus précisément un dimère de dimères. Le site actif est formé par un dimère et il existe un site allostérique putatif à l'interface de trois des sous-unités du tétramère, qui pourrait par exemple permettre de stabiliser la forme tétramérique. Les cofacteurs de la TDO sont l'hème et le fer (Kurnasov et al., 2003). *P. aeruginosa* utilise le tryptophane, via la voie des kynurénines, pour produire de l'anthranylate et donc du PQS en milieu riche. A l'inverse, c'est le chorismate, via PhnAB, qui est utilisé pour produire de l'anthranylate en milieu minimum (Farrow and Pesci, 2007). De plus, à l'heure actuelle, il n'a pas encore été mis en évidence que *P. aeruginosa* a la capacité de synthétiser d'autres molécules de la voie des kynurénines, telles que la 3-hydroxy-kynurénine ou l'acide kynurénique.

Il y a des résultats contradictoires concernant la concentration en tryptophane, le substrat de la voie des kynurénines, dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. D'une part, il a été mis en évidence que les expectorations de patients atteints de mucoviscidose sont riches en acides aminés, permettant ainsi la croissance de souches auxotrophes (Barth and Pitt, 1996). D'autre part, il semble que les expectorations contiennent une faible concentration en tryptophane libre (<10µM) (Palmer et al., 2007). Afin d'estimer si la voie des kynurénines est une source potentielle de PQS lors de l'infection, il faudrait

évaluer si cette voie est fonctionnelle et active dans les isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose.

A retenir :

- Chez *P. aeruginosa*, le tryptophane est le précurseur des auxines, de l'acétyl-CoA et du PQS via la production d'anthranilate
- Il existe deux voies de synthèse de l'anthranilate, la voie des kynurénines et celle du chorismate
- Le chorismate est le précurseur de l'anthranilate et des phénazines
- En milieu riche, le PQS est produit via la voie des kynurénines et en milieu minimum via la conversion du chorismate en anthranilate

1.2 La régulation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*

Le gène *kynA* est localisé séparément des gènes *kynB* et *kynU* qui sont regroupés dans un opéron putatif. La kynurénine, mais pas le tryptophane ni l'anthranilate, active la transcription des gènes *kynA* et *kynB*, générant une boucle de régulation positive (Farrow and Pesci, 2007). Deux régulateurs de la voie des kynurénines ont été mis en évidence : LasR et KynR.

LasR est le régulateur transcriptionnel du système *las*, qui contrôle la production de 3-oxo-C12-HSL, ainsi que l'expression d'un grand nombre de gènes. LasR est impliqué, directement ou indirectement dans le contrôle de plus de 300 gènes et parmi ceux-ci, *kynB* et *kynU* (Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003). De plus, il s'agit d'une régulation directe, car LasR se fixe sur le promoteur de *kynB* (Gilbert et al., 2009). Il a été démontré que LasR participe à la régulation positive et kynurénine-dépendante de ce gène (Knoten et al., 2011, **Figure 17**).

KynR est un régulateur transcriptionnel de type Lrp/AsnC (Leucin-responsive regulator protein / asparagine synthase C). Les régulateurs Lrp et AsnC sont affectés par la leucine et par l'asparagine respectivement, permettant la régulation des voies métaboliques de ces acides aminés (Yokoyama et al., 2006). De façon générale, les homologues de Lrp agissent comme des régulateurs liés au métabolisme des acides aminés, avec un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. En outre, ils peuvent agir à la fois comme inducteurs et comme répresseurs (Brinkman et al., 2003). En ce qui concerne le régulateur KynR, il contrôle l'activité transcriptionnelle de *kynA* et *kynB* en présence de kynurénine. Pour cela, KynR se lie au promoteur *kynA*, uniquement en présence de kynurénine.

Concernant le promoteur *kynB*, KynR peut s'y fixer en présence et en l'absence de kynurénine, la kynurénine augmentant l'affinité de KynR pour le promoteur. De plus, il y a des sites multiples de fixation de ce régulateur au promoteur du gène *kynB*. Dans ce cas, KynR pourrait agir également comme répresseur. Dans les deux cas, la kynurénine agit comme coinducteur pour la transcription de ces deux gènes (Knoten et al., 2011, **Figure 17**).

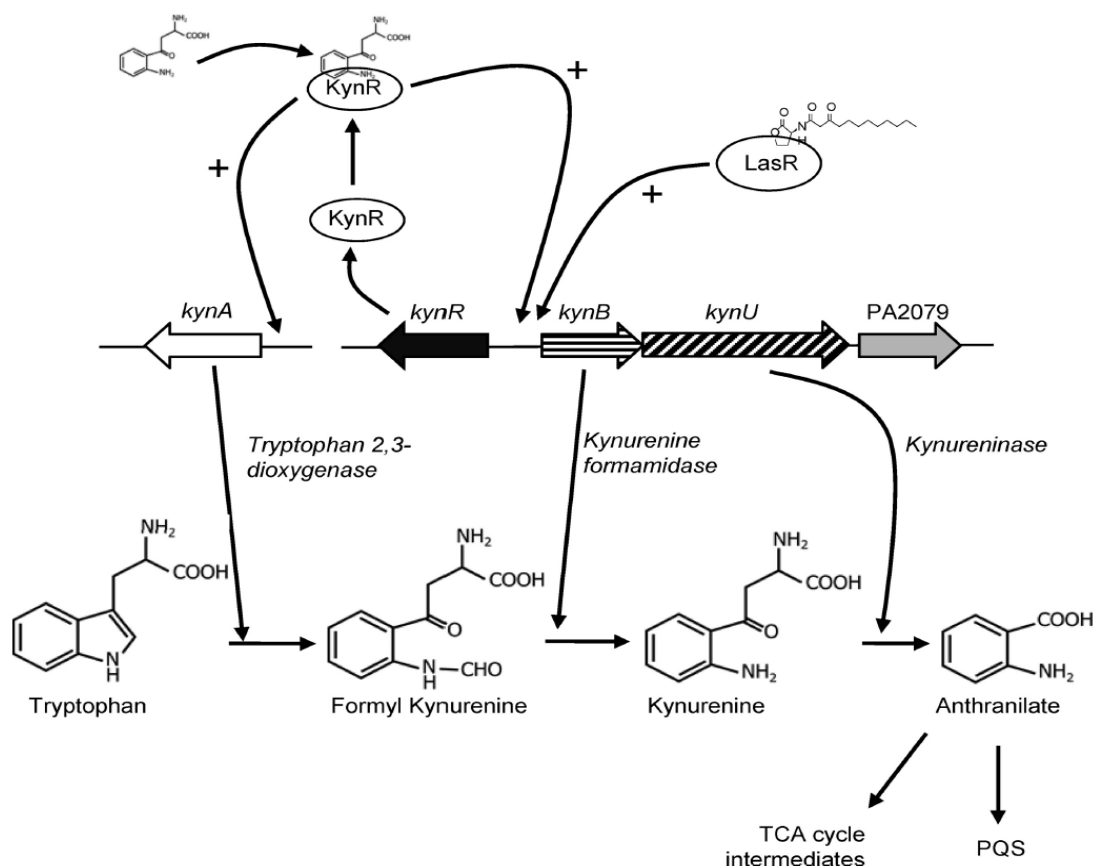


Figure 17 : Modèle de la régulation de la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa* (Knoten et al., 2011)

La kynurénine produite grâce aux enzymes KynA et KynB se fixe aux facteurs de transcription KynR et LasR qui activent à leur tour la transcription des gènes de la voie des kynurénines. KynR, en complexe avec la kynurénine, induit la transcription du gène *kynA* et de l'opéron putatif *kynBU*. LasR, en complexe avec la kynurénine induit la transcription de l'opéron putatif *kynBU*. L'anthranilate produit via la voie des kynurénines peut ensuite être utilisé pour la production de PQS ou d'acétyl-coA pour le cycle de Krebs. TCA : tricarboxylic acid cycle ou cycle de Krebs.

Chez d'autres espèces bactériennes, comme *Bacillus cereus*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia cenocepacia* ou *Ralstonia metallidurans*, les gènes *kynA*, *kynB* et *kynU* sont sur un même opéron putatif. Chez *P. aeruginosa*, comme cela a été dit précédemment, le gène *kynA* est localisé séparément des gènes *kynB* et *kynU* qui sont regroupés dans un opéron putatif (Knoten et al., 2011; Kurnasov et al., 2003). De plus, il a été montré que la souche mutante pour le gène *kynB* est capable de produire de la kynurénine, bien que cela soit de

façon réduite (Farrow and Pesci, 2007), indiquant une hydrolyse naturelle du N-formyl-kynurénine en kynurénine (**Figure 15**). Cela indique qu'il y a probablement une accumulation de la kynurénine et que cette dernière n'est pas forcément immédiatement convertie en anthranilate. De plus, la kynurénine a potentiellement un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, la voie des kynurénines est connue chez l'hôte pour avoir un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire et cette molécule pourrait donc faire partie des mécanismes de dialogue inter-règles.

Des résultats préliminaires ont été obtenus au laboratoire et ont mis en avant une perte de virulence pour une souche mutée de *P. aeruginosa* ne produisant pas de kynurénine comparée aux souches productrices. Une augmentation de la survie des souris, suite à une infection par voie intranasale par la souche de *P. aeruginosa* ne produisant pas de kynurénine, a été observée, ainsi qu'une diminution des marqueurs de virulence, tels que la perte de poids des souris, la charge bactérienne pulmonaire et la perméabilité pulmonaire (Chaker, 2012).

A retenir :

- Le gène *kynA* est localisé séparément des gènes *kynB* et *kynU* qui sont regroupés sur un opéron putatif
- La kynurénine active la transcription des gènes de la voie des kynurénines
- Le régulateur transcriptionnel LasR active la transcription de *kynB* de façon dépendante de la kynurénine
- Le régulateur transcriptionnel KynR active la transcription de *kynA* et de *kynB* de façon dépendante de la kynurénine
- La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est impliquée dans la virulence de la bactérie lors de l'infection pulmonaire aiguë chez la souris
- La kynurénine produite par *P. aeruginosa* pourrait être impliquée dans le dialogue inter-règles avec l'hôte

2 La voie des kynurénines de l'hôte

2.1 Généralités

La voie des kynurénines est la voie majeure du catabolisme du tryptophane chez l'Homme (**Figure 18**).

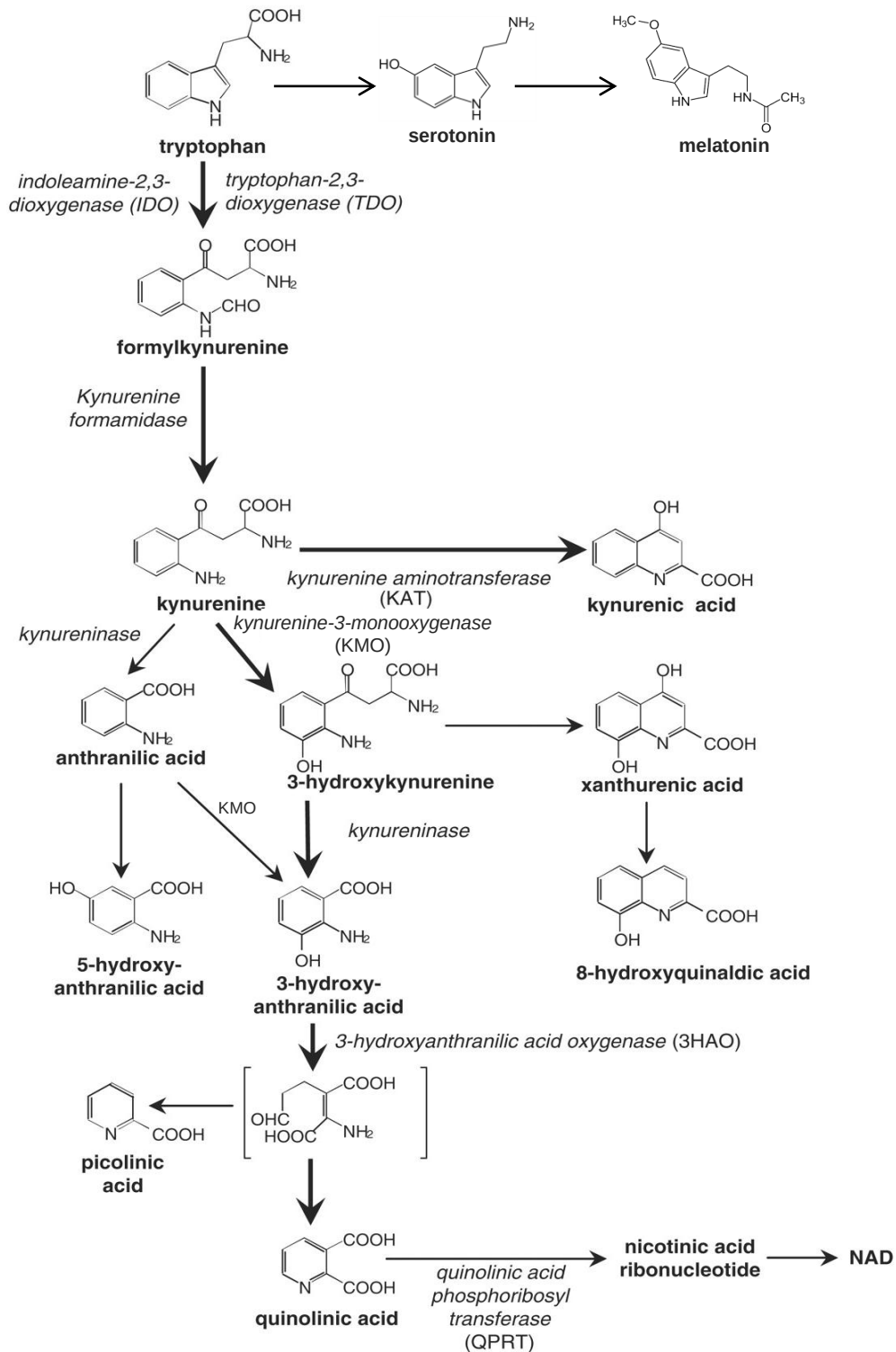


Figure 18 : Voies du métabolisme du tryptophane chez l'Homme

Le tryptophane est converti en kynurénine grâce à la TDO ou l'IDO et la kynuréninase. La kynurénine peut ensuite être convertie en acide kynurénique par la kynurénine aminotransférase ou en 3-hydroxy-anthranylate par la kynurénine-3-monooxygénase et la kynuréninase. Le 3-hydroxy-anthranylate peut être converti en acide picolinique ou en acide quinolinique qui à son tour peut être converti en NAD.

Comme décrit précédemment, l'IDO (indoléamine 2, 3 dioxygénase) ou la TDO (tryptophane 2, 3 dioxygénase) et la kynurénine formidase permettent de convertir le tryptophane en kynurénine. Par la suite, la kynurénine peut être convertie en acide kynurénique par la kynurénine aminotransférase ou en 3-hydroxy-anthranylate par la kynurénine-3-monooxygénase et la kynuréninase. Deux voies permettent la formation de 3-hydroxy-anthranylate, par conversion de la kynurénine en anthranylate ou en 3-hydroxy-kynurénine. Le 3-hydroxy-anthranylate peut ensuite être converti en acide picolinique ou en acide quinolinique, qui est le précurseur du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (González et al., 2008).

La TDO et l'IDO sont les enzymes limitantes de la voie des kynurénines. Ces deux enzymes diffèrent notamment dans leur localisation, leur structure, leur spécificité de substrat et leur régulation (González et al., 2008). La TDO est une enzyme hépatique constitutive homotétramérique (Dick et al., 2001), spécifique du L-tryptophane avec une affinité relativement faible pour son substrat (Capece et al., 2011). Cette enzyme est induite par le tryptophane et la kynurénine et utilise l'O₂ pour le clivage oxydatif du tryptophane. L'IDO est une enzyme monomérique, qui a une distribution tissulaire plus large. Elle est fortement exprimée dans les poumons, les intestins, le placenta, la rate et l'épididyme et également dans certaines cellules de l'immunité comme les DC et les macrophages (Dai and Zhu, 2010; Schmidt and Schultze, 2014; Yamazaki et al., 1985). Contrairement à la TDO, l'IDO a une forte affinité pour le L-tryptophane et a également pour substrat le D-tryptophane et le 5-hydroxy-tryptophane. En plus de l'O₂, les anions superoxydes peuvent également être utilisé par l'IDO comme source d'oxygène pour la réaction d'oxydation (González et al., 2008). Il existe deux isoformes de cette enzyme chez l'Homme, l'IDO1 et l'IDO2.

La voie des kynurénines de l'Homme est impliquée dans la médiation de nombreux phénomènes immunologiques, tels que la tolérance materno-fœtale, l'acceptation d'allogreffe, mais aussi dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire (Curti et al., 2009; Johnson and Munn, 2012; Platten et al., 2012; Le Rond et al., 2005).

De plus il a été mis en évidence que la voie des kynurénines peut jouer un rôle important dans les infections (virales, fongiques et bactériennes), avec un impact bénéfique ou délétère pour l'hôte (Schmidt and Schultze, 2014). La déplétion en tryptophane du microenvironnement et la production de métabolites potentiellement toxiques par la voie de kynurénines permet d'inhiber la réplication de certains parasites et de certaines bactéries et peut également inhiber la propagation virale. A l'inverse, via son action immunosuppressive,

un déséquilibre de l'activation de la voie des kynurénines peut favoriser l'infection. Le cas le plus connu est celui du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La protéine Tat du VIH induit une production d'IDO par les DC, générant un dysfonctionnement de la réponse contre ce virus (Boasso et al., 2007; Planès and Bahraoui, 2013).

A retenir :

- Dans la réponse immunitaire, la voie des kynurénines est médiée par l'IDO
- La voie des kynurénines joue un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire
- La voie des kynurénines a un rôle important dans les infections, grâce à la déplétion du tryptophane dans le milieu et la production de métabolites toxiques
- Un déséquilibre dans l'activation de la voie des kynurénines de l'hôte peut favoriser l'infection

2.2 La régulation de l'IDO dans les cellules de l'hôte

2.2.1 Régulation de l'expression de l'IDO

La transcription de l'IDO est fortement inductible par l'IFN- γ et, dans une moindre mesure, par l'IFN α et β . Le promoteur de l'IDO contient deux éléments de réponse à l'IFN : ISRE (IFN-Stimulated Response Element) et GAS (IFN- γ Activating Site) (Konan and Taylor, 1996). L'activation de la transcription de l'IDO est médiée par STAT1 et IRF1. STAT1 peut se lier directement au site GAS et en coopération avec IRF1 au site ISRE pour induire la transcription de l'IDO (González et al., 2008). Ces deux facteurs de transcription jouent un rôle clé dans l'induction de l'IDO. Lors d'une infection, les souris IRF1^{-/-} sont déficientes pour la transcription de l'IDO (Silva et al., 2002).

Le TNF- α ne peut pas induire directement la transcription de l'IDO, mais peut agir en synergie avec l'IFN- γ de façon dose dépendante (Robinson et al., 2005). Lorsque les cellules pré-traitées à l'IFN- γ sont exposées au TNF- α et à l'IL-1, il y a une augmentation de la transcription de l'IDO. De plus, en présence de ces cytokines, une dose moindre d'IFN- γ est nécessaire pour obtenir le même niveau de transcription (Babcock and Carlin, 2000). Également, lorsque les DC immatures sont exposées au TNF- α et au PGE-2, ces cellules expriment fortement l'IDO. Isolément, le TNF- α et le LPS seul ne sont pas suffisants pour induire une transcription de l'IDO, mais représentent un second signal nécessaire à l'activation de cette enzyme suite à l'activation par le PGE-2 (Braun et al., 2005).

En plus des cytokines pro-inflammatoires citées précédemment, la transcription de l'IDO peut également être induite par le TGF- β . Cette cytokine immunosuppressive peut agir

de façon autocrine pour induire la tolérance de DC ou des macrophages produisant cette cytokine (Belladonna et al., 2008, 2009).

Certaines cytokines peuvent avoir un effet inhibiteur, de façon indirecte. L'IL-4 comme décrit précédemment, participe au maintien de la réponse Th2 en inhibant la réponse Th1 et plus particulièrement par l'inhibition de l'INF- γ . Lors de l'infection d'une lignée cellulaire par *Toxoplasma gondii*, l'induction de la production d'IL-4 et d'IL-13 génère une inhibition de la production d'INF- γ et donc une inhibition de la transcription de l'IDO ainsi que du métabolisme du tryptophane (Chaves et al., 2001; Mándi and Vécsei, 2012).

La voie des kynurénines joue un rôle important dans les infections par des pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium avium* et il a été montré que la stimulation du TLR9 induit une forte expression de l'IDO (Hayashi et al., 2001, 2004). Vraisemblablement, cette induction de l'IDO, suite à la stimulation du TLR9, provient de l'induction de la production d'INF- α et d'INF- γ ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires, pouvant agir en synergie pour induire l'expression de l'IDO (Krieg, 2006). Suite à l'exposition chronique des souris au BCG, qui entraîne entre autre la stimulation du TLR4, une induction de l'IDO dépendante de l'INF- γ a été observée. Chez les souris déficientes pour le récepteur à l'INF- γ , une forte inhibition de l'expression de l'IDO a été observée (O'Connor et al., 2009).

Une autre étude a montré que le LPS, en synergie avec le TNF- γ , l'IL-6 et l'IL-1 β , peut induire l'expression de l'IDO de façon indépendante de STAT1 et IRF1 et donc indépendamment de l'INF- γ . Il a également été mis en avant dans cette étude que cette activation est dépendante de la voie NF- κ B et de p38 MAPK, car l'inhibition de chacune de ces deux voies inhibe l'induction de l'IDO (Fujigaki et al., 2006). Cette induction indépendante de l'INF- γ a également été montrée dans des cellules infectées par le virus d'Epstein Barr, la neutralisation de l'IL-6 et du TNF- α entraînant une inhibition de la transcription de l'IDO. Dans cette étude, l'inhibition de la voie NF- κ B et de p38 MAPK génère une inhibition de la production d'IL-6 et de TNF- α , conduisant à l'inhibition de la transcription de l'IDO (Liu et al., 2014). Parallèlement, l'inhibition de l'IL-6 ou du facteur de transcription STAT3 entraîne une diminution de la transcription de l'IDO par les cellules cancéreuses. Le promoteur de l'IDO possède un site de liaison de STAT3, et donc l'IL-6 via STAT3, peut induire la transcription de l'IDO de façon indépendante de l'INF- γ (Litzenburger et al., 2014; Sun et al., 2009).

Le récepteur des molécules de costimulation exprimé par les lymphocytes Treg, CTLA-4, peut également induire la transcription de l'IDO. La protéine de fusion CTLA4-

Immunoglobuline (CTLA4-Ig) induit la production d'IDO via l'interaction avec les molécules de costimulation CD80/86 des cellules dendritiques. Il s'agit d'une induction dépendante de l'IFN- γ . L'interaction de CTLA4-Ig avec CD80/86 induit une forte production d'IFN- γ et, via une signalisation autocrine et paracrine, induit la production d'IDO (Grohmann et al., 2002). Le CTLA-4 membranaire exprimé par les Treg, en se liant avec CD80/86 des DC, permet que l'IDO produite sous forme inactive devienne fonctionnelle. Si l'interaction avec CTLA-4 est perturbée, l'IDO reste à l'état inactif (Munn et al., 2004). Chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, le défaut d'expression de CTLA-4 par les Treg entraîne un défaut d'expression et d'activation de l'IDO et donc une déficience de l'immunomodulation par la voie des kynurénines (Cribbs et al., 2014).

A retenir :

- La transcription de l'IDO est induite par l'interféron, en particulier l'IFN- γ , l'IL-6 et le TGF- β
- Le TNF- γ agit en synergie avec d'autres signaux pro-inflammatoires pour induire la transcription de l'IDO
- L'IL-4 et l'IL-13, en inhibant la production d'IFN- γ , inhibent la transcription de l'IDO
- CTLA-4 participe à l'induction de l'expression et à l'activation de l'IDO

2.2.2 Régulation post-traductionnelle de l'IDO

Il existe également plusieurs mécanismes de régulation post-traductionnels permettant de réguler la voie des kynurénines (Fujigaki et al., 2012). Deux résidus tyrosine de l'IDO peuvent être phosphorylés, générant une reconnaissance par SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) et une ubiquitinylation du complexe IDO/SOCS3, qui entraîne une dégradation par le protéasome (Orabona et al., 2008).

L'oxyde nitrique (NO) inhibe l'activité IDO dans les cellules activées par l'IFN- γ en se liant à l'hème (Thomas et al., 1994) et peut également affecter la stabilité de l'enzyme en favorisant sa dégradation par le protéasome (Hucke et al., 2004). Comme décrit précédemment, le NO, avec l'O $_2^-$, peut former du peroxynitrite. Ce composé entraîne une nitration de plusieurs résidus tyrosine de l'IDO et permet l'inactivation de l'enzyme. Plusieurs FRO ont également été mises en évidence pour avoir un rôle dans la régulation de l'activité de l'enzyme. L'O $_2^-$ sert à la fois de substrat à l'IDO, comme expliqué précédemment, et de cofacteur. Les anions superoxydes peuvent réduire la forme ferrique inactive de l'IDO à la forme ferreuse active (Hayaishi, 1996; Thomas and Stocker, 1999). La pyrrolidine

dithiocarbamate, un antioxydant qui inhibe fortement l'O₂⁻, inhibe l'activité de l'IDO chez les macrophages activées par l'IFN-γ (Thomas et al., 2001). A l'inverse, l'H₂O₂ inhibe l'IDO via l'oxydation de plusieurs résidus cystéine en acide sulfinique ou sulfonique. L'activité de l'enzyme peut être partiellement restaurée en présence de thiorédoxine, cet effet inhibiteur est donc partiellement réversible (Freewan et al., 2013; Poljak et al., 2006). Ces mécanismes permettent lors d'une inflammation d'inhiber l'effet tolérogène de la voie des kynurénines et donc une réponse immunitaire plus intense.

A retenir :

- La phosphorylation de résidus tyrosine de l'IDO induit sa dégradation par le protéasome
- Les espèces réactives de l'azote inhibent l'IDO en se liant à l'hème, en affectant la stabilité de l'enzyme et par nitration de résidus tyrosine
- L'O₂⁻ est un substrat de l'IDO et un cofacteur, permettant de réduire l'enzyme à sa forme ferreuse active
- L'H₂O₂ inhibe l'IDO par oxydation de résidus cystéine

2.3 Les récepteurs des métabolites de la voie des kynurénines

2.3.1 Les récepteurs d'aryl-hydrocarbone (AhR)

La kynurénine, la 3-hydroxy-kynurénine et l'acide kynurénique sont des ligands du récepteur d'aryl-hydrocarbone (AhR) (DiNatale et al., 2010; Mezrich et al., 2010). Il s'agit d'un facteur de transcription, membre de la superfamille des protéines Per-Arnt-Sim (PAS). Ce récepteur possède une séquence NLS (Nuclear Location Sequence) et une séquence NES (Nuclear Export Sequence), lui permettant de transiter entre le cytoplasme et le noyau (**Figure 19**). Au stade latent, en l'absence de ligand, l'AhR est localisé dans le cytoplasme et associé à des protéines chaperonnes, telles que Hsp90 (Heat shock protein 90). Lors de l'association avec son ligand, cela entraîne une rapide translocation dans le noyau, la formation d'un hétérodimère avec la protéine ARNT (AhR Nuclear Translocator) et le relargage des protéines chaperonnes. Le complexe ligand/AhR/ARNT se lie ensuite à des séquences d'ADN consensus apparentées (TNGCGTG) connues comme étant les éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) (Hao and Whitelaw, 2013; Stockinger et al., 2011). Les XRE sont présents en amont d'un grand nombre de gènes, suggérant un potentiel de régulation étendu par les AhR (Sun et al., 2004).

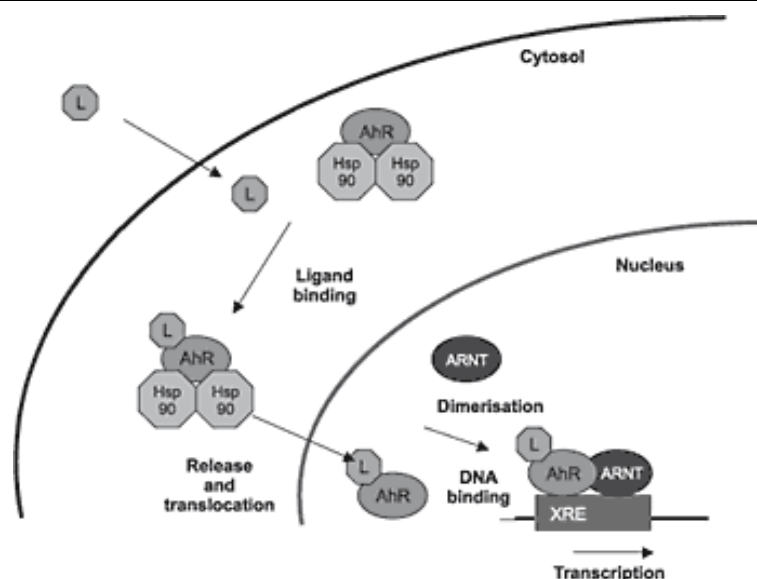


Figure 19 : Mécanisme d'activation des AhR (Westwell, 2004)

Au stade latent, le récepteur d'aryl-hydrocarbure (AhR) est dans le cytosol associé à des protéines chaperonnes, comme Hsp90 (Heat shock protein 90). Lors de l'association avec son ligand l'AhR est rapidement transloqué dans le noyau et forme un hétérodimère avec la protéine ARNT (AhR Nuclear Translocator) et les protéines chaperonnes sont relarguées. Le complexe ligand/AhR/ARNT se lie ensuite aux éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) pour induire la transcription de gènes cible.

L'AhR possède une poche de liaison au ligand qui permet d'accueillir un grand nombre de composés planaires hydrophobes. Le spectre de gènes régulés par les AhR est fortement dépendant des propriétés chimiques du ligand ainsi que du type cellulaire. Plusieurs types cellulaires de l'immunité expriment les AhR (**Figure 20**). Dans les cellules de l'immunité innée, les cellules dérivées des monocytes, les macrophages et les DC, expriment fortement les AhR. Les cellules lymphoïdes innées (ILC) et en particulier les ILC du groupe 3, productrices d'IL-17 et d'IL-22, expriment aussi ce récepteur (Kiss et al., 2011). Concernant les cellules de l'immunité adaptative, les Th17 sont les cellules exprimant le plus fortement les AhR. Les Treg et les lymphocytes B l'expriment également, mais plus faiblement (Stockinger et al., 2011).

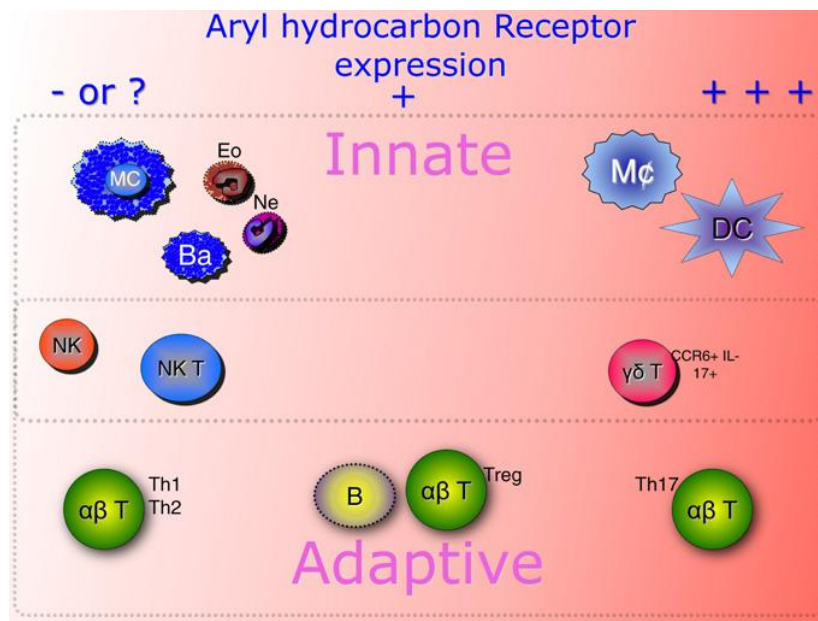


Figure 20 : Expression des AhR par les cellules de l'immunité (Stockinger et al., 2011)
(- ou ?) cellules n'exprimant pas les AhR ou non connu ; (+) cellules exprimant faiblement les AhR ; (+++) cellules exprimant fortement les AhR. Mc : Mastocytes ; Eo : eosinophiles ; Ne : neutrophiles ; Ba : basophiles ; Mφ : macrophages ; DC : cellules dendritiques ; NK : natural killer ; γδ T : lymphocytes T γδ ; αβ T : lymphocytes T αβ ; B : lymphocytes B.

Les ligands des AhR, et les AhR en soi, sont connus pour avoir un rôle dans la régulation de l'immunité, comme la différenciation des Th17 et des Treg, la réponse inflammatoire des macrophages, la réponse T induite par les DC et leur production de cytokines ou encore la différenciation des lymphocytes B (Nguyen et al., 2013). De même, l'activation des AhR peut entraîner la transcription de l'IDO, permettant potentiellement une boucle de régulation positive de la voie des kynurénines (Mezrich et al., 2010).

A retenir :

- La kynurénine, la 3-hydroxy-kynurénine et l'acide kynurénique sont des ligands des récepteurs d'aryl-hydrocarbure (AhR)
- En complexe avec son ligand, l'AhR est transloqué dans le noyau et se lie aux éléments de réponse aux xénobiotiques de nombreux gènes
- La régulation de la transcription des gènes est dépendante du ligand
- Les macrophages, les cellules dendritiques, les Th17 et, dans une moindre mesure, les Treg et les cellules B expriment ce récepteur
- Les AhR sont connus pour réguler plusieurs aspects de la réponse immune

2.3.2 Le récepteur couplé aux protéines G : GPR35

L'acide kynurénique, mais aucun autre métabolite de la voie des kynurénines, est un ligand du récepteur couplé aux protéines G GPR35 (Wang et al., 2006). Il s'agit d'une grande famille de récepteurs membranaires chez les mammifères, qui doivent leur appellation à leur capacité de couplage, une fois activés, à des protéines liant le GTP, aussi appelées protéines G. GPR35 est fortement exprimé par les monocytes, les DC, les lymphocytes T et les neutrophiles et plus faiblement par les cellules NK, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes B (Wang et al., 2006).

Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent avoir un rôle important dans la régulation de l'inflammation (Thorburn et al., 2014). Des mutations de ces récepteurs sont impliquées dans une large variété de maladies génétiques humaines (Thompson et al., 2014). Plus particulièrement, GPR35 est connu pour être une cible thérapeutique potentielle car il a un rôle dans l'inflammation, l'hypertension, l'asthme et le diabète (Mackenzie et al., 2011).

A retenir :

- L'acide kynurénique est un ligand du récepteur couplé aux protéines G GPR35
- GPR35 est fortement exprimé par les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les neutrophiles
- GPR35 est connu pour avoir un rôle dans l'inflammation

2.4 La régulation de la réponse immunitaire par la voie des kynurénines de l'hôte

Plusieurs études ont montré que l'IDO, et donc la voie des kynurénines, régule la réponse inflammatoire lors d'une infection. Lors d'une infection gastro-intestinale par *Candida albicans*, si l'IDO est inhibée par un analogue non métabolisable du substrat, le 1-méthyl-tryptophane (1MT), il y a une augmentation de la production d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α et une diminution de la production d'IL-10 par les souris (Bozza et al., 2005). Dans le cadre d'une infection intra-nasale par le virus de la grippe, l'inhibition de l'IDO par le 1MT génère une augmentation de la production d'IL-6, de TNF- α et d'IFN- β dans les poumon, ainsi qu'une augmentation de l'expression des PRR, tels que le TLR6 (Fox et al., 2013, 2014). Lors d'une infection par *E. coli* uropathogène des souris IDO^{-/-}, une augmentation de la production d'IL-1 α et β , d'IL-6, d'IL-12, d'IL-17, de G-CSF, de KC (équivalent fonctionnel de l'IL-8 chez la souris), de MCP1, de MIP1 α et β et d'IFN α et γ est observée comparé aux souris WT. Il y a

également une augmentation du recrutement des leucocytes et en particulier des neutrophiles chez les souris déficientes pour l'IDO (Loughman and Hunstad, 2012). Lors d'une exposition à du LPS chez les souris IDO^{-/-}, une augmentation de la production d'IL-6 et de TNF- α ainsi qu'une diminution de la production d'IL-10 et de TGF- β est observée (Bessede et al., 2014).

Ceci montre que l'IDO, et donc la voie des kynurénines, régule négativement la réponse pro-inflammatoire lors d'une infection.

A retenir :

- L'inhibition de l'IDO entraîne une augmentation de la réponse pro-inflammatoire et une diminution de la réponse anti-inflammatoire
- L'IDO régule donc la réponse inflammatoire
- Selon les modèles, cela peut être bénéfique ou délétère

2.4.1 Régulation de la réponse immunitaire innée par la voie des kynurénines de l'hôte

L'inhibition de l'IDO par le 1MT lors de l'infection des neutrophiles de souris par *C. albicans* entraîne une diminution de l'activité fongicide et de la phagocytose et paradoxalement une augmentation de la production d'O₂⁻ ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. A l'inverse, l'activation de l'IDO lors de l'infection des neutrophiles de souris par *C. albicans* entraîne une augmentation de l'activité fongicide et une diminution de la production d'O₂⁻. L'IDO des neutrophiles favoriserait donc l'activité fongicide et la phagocytose par ces cellules et inhiberait la production d'O₂⁻ ainsi que l'apoptose lors de l'infection par *C. albicans*. Cependant, l'IDO ayant également un rôle d'inhibition de la forme hyphale de *C. albicans*, qui est la forme virulente, les effets observés peuvent être partiellement dus à l'effet de la voie des kynurénines sur cette levure (Bozza et al., 2005). En outre, l'IDO a été proposé pour avoir un rôle dans l'inflammation chronique des patients atteints de granulomatose septique chronique (CGD) et donc ayant un déficit de la production de FRO. L'hypothèse était que l'absence du cofacteur, les anions superoxydes, inhiberait la voie des kynurénines. Une diminution de l'expression de l'IDO a été mise en évidence dans les neutrophiles des souris déficientes pour la NADPH oxydase (Romani et al., 2008). Cependant, plusieurs études réalisées sur des cellules humaines de patients atteints de CGD ont montré une activité normale de l'IDO et un ratio kynurénine/tryptophane (révélateur de l'activité de la voie des kynurénines) inchangé dans le sérum de patients atteints de CGD (Jürgens et al., 2010; De Ravin et al., 2010). De plus, une étude récente a démontré que la

NADPH oxydase phagocytaire n'est pas nécessaire à l'activité de l'IDO (Maghzal et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que l'acide kynurénique inhibe la sécrétion de l' α -défensine par les neutrophiles (Tiszlavicz et al., 2011).

L'acide kynurénique a également un impact sur la réponse des monocytes. En effet, ce métabolite inhibe la production de TNF- α , au niveau transcriptionnel, par les monocytes, ainsi que la sécrétion de HMGB1 (High-Mobility Group Box protein 1), une cytokine pro-inflammatoire tardive (Tiszlavicz et al., 2011; Wang et al., 2006).

L'inhibition de l'IDO par le 1-MT, lors de l'infection de macrophages par le virus de la grippe, entraîne une augmentation de la production d'IL-6, d'IL-1 β , de TNF- α et d'IFN- α (Fox et al., 2014). Cela est probablement dû au fait que la voie des kynurénines favorise une polarisation des macrophages en M2 (anti-inflammatoires). Des expériences de coculture des cellules souches mésenchymateuses, dont la production d'IDO a été induite, avec des monocytes issus de sang humain ont été réalisées. Cela génère chez les monocytes une expression du récepteur au mannose et une production d'IL-10, caractéristique des macrophages M2. L'inhibition de l'IDO par du 1MT lors de la coculture entraîne une diminution de la production d'IL-10, suggérant que l'IDO favorise une polarisation en macrophage M2 (François et al., 2012). Une autre expérience a été menée en mettant en coculture des macrophages issus de monocytes avec des cellules stromales de l'endomètre WT ou surexprimant l'IDO. Lors de la coculture avec les cellules surexprimant l'IDO, une diminution des marqueurs associés au phénotype M1 a été observée ainsi qu'une augmentation des marqueurs associés au phénotype M2. Une augmentation de la production d'IL-33, une cytokine connue pour être impliquée dans la réponse de type 2 (Schmitz et al., 2005), a aussi été observée. L'induction d'un phénotype M2 par l'IDO semble se faire par l'intermédiaire de l'IL-33 (Mei et al., 2014). L'effet de l'IDO sur la polarisation de la lignée cellulaire monocytique THP-1 différenciée a également été étudié. La surexpression d'IDO par ces cellules induit un phénotype M2 et inhibe le phénotype M1. A l'inverse, une inhibition de l'IDO induit un phénotype M1 et inhibe le phénotype M2 (Wang et al., 2014a). L'IDO semble donc favoriser la polarisation M2, anti-inflammatoire, probablement afin de restreindre une activation immunitaire excessive et de permettre la résolution de l'inflammation.

A retenir :

- La voie des kynurénines pourrait avoir un effet sur l'activité fongicide et la production de FRO par les neutrophiles
- L'acide kynurénique inhibe la sécrétion d' α -défensine par les neutrophiles et de TNF- α et de HMGB1 par les monocytes
- L'IDO favorise la différenciation des monocytes en macrophages M2
- La surexpression de l'IDO favorise une polarisation en macrophage M2 et l'inhibition de l'IDO favorise une polarisation en macrophage M1

2.4.2 Régulation de la réponse immunitaire adaptative

La voie des kynurénines agit sur l'immunité adaptative à la fois grâce à la déplétion en tryptophane dans le milieu et par la production de métabolites potentiellement cytotoxiques (Munn and Mellor, 2013). Lorsque les lymphocytes T sont mis au contact avec des DC produisant l'IDO, il y a une inhibition de la prolifération des lymphocytes, et l'ajout de tryptophane dans le milieu restaure cette prolifération. La privation de tryptophane active une sérine/thréonine kinase permettant la détection de carence en acides aminés, GCN2 (General Growth Nonderepressible 2). La kinase GCN2 est activée lors de la liaison avec un ARN de transfert non chargé. Cela initie un programme de stress et peut provoquer l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation ou l'apoptose en fonction du type cellulaire et de l'origine du stress. Une diminution de l'anergie des lymphocytes induite par l'IDO est observée chez les souris déficientes pour GCN2 (Munn et al., 2005). Une autre voie de signalisation sensible à la carence en acides aminés est connue pour être impliquée dans l'immunorégulation, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), qui est une autre sérine/thréonine kinase. En l'absence de certains acides aminés essentiels, dont le tryptophane, il y a une inhibition de la voie de la signalisation mTOR. Cette voie est connue pour favoriser la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs et pour inhiber la différenciation en Treg (Powell et al., 2012). La déplétion en tryptophane par l'IDO inhibe la voie mTOR et pourrait donc participer à l'inhibition des lymphocytes T effecteurs et à l'induction des Treg (Metz et al., 2012; Munn and Mellor, 2013).

Plusieurs métabolites de la voie des kynurénines ont une action cytotoxique sur les lymphocytes. Un milieu pauvre en tryptophane contenant de la kynurénine induit une augmentation de la production d'IL-10 et de TGF- β et une diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4 activés. Egalement dans ces conditions il y a une induction de la transcription de Foxp3, induisant un phénotype Treg. Un milieu pauvre en

tryptophane uniquement n'est pas suffisant pour obtenir cet effet (Fallarino et al., 2006). Par ailleurs, la kynurénine et l'acide picolinique, à des doses allant de 50 à 1000µM, inhibent la prolifération des lymphocytes du sang périphérique et ont des effets cumulatifs. A nouveau, la privation en tryptophane amplifie l'effet de ces métabolites (Frumento et al., 2002). La 3-hydroxy-kynurénine et le 3-hydroxy-anthranylate peuvent également inhiber la prolifération des lymphocytes du sang périphérique activés et induire leur apoptose. A nouveau, un effet cumulatif a été observé. Un mélange de kynurénine, de 3-hydroxy-kynurénine et de 3-hydroxy-anthranylate induit l'apoptose des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules NK mais pas des DC (Terness et al., 2002). En outre, seuls les lymphocytes activés sont inhibés par les métabolites de la voie des kynurénines (Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002).

La cytotoxicité causée par les métabolites de la voie des kynurénines peut être différente selon l'état de différenciation des lymphocytes T helpers. Après 24h d'incubation de lignées clonales Th1 ou Th2 avec seulement 10µM de 3-hydroxy-anthranylate ou d'acide quinolinique, il y a une apoptose des Th1, mais pas des Th2 (Fallarino et al., 2002). Une autre étude a été menée en étudiant la survie des lymphocytes et leur production de cytokines, après 48h d'activation en présence de concentrations croissantes en 3-hydroxy-anthranylate. Dès 10µM le 3-hydroxy-anthranylate induit une apoptose des Th1 et une inhibition de la production d'IFN-γ. Seulement à partir de 50µM le 3-hydroxy-anthranylate induit une inhibition de la prolifération des lymphocytes Th2 et une inhibition de la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10. En outre, 100µM sont nécessaires pour induire l'apoptose des Th2 (Hayashi et al., 2007).

Cela indique, indirectement, que l'IDO peut favoriser une réponse Th2 et déséquilibrer la balance Th1/Th2 (Xu et al., 2008a). Dans un modèle expérimental d'asthme chronique, les souris déficientes pour l'IDO produisent moins d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-13 et davantage d'IFN-γ et ont une réponse humorale diminuée (Xu et al., 2008b). Parallèlement, lors d'une infection intranasale chez les souris par le virus de la grippe, l'inhibition de l'IDO par le 1MT génère une augmentation du nombre de cellules productrices d'IFN-γ et d'IL-6, mais pas d'IL-4 (Fox et al., 2013). Donc, la forte inhibition de la réponse Th1 par l'IDO permettrait le développement de la réponse Th2, qui à son tour inhiberait la réponse Th1. Par la suite, la voie des kynurénines induirait une réponse Treg qui inhibe à la fois la réponse Th1 et la réponse Th2 (**Figure 21**).

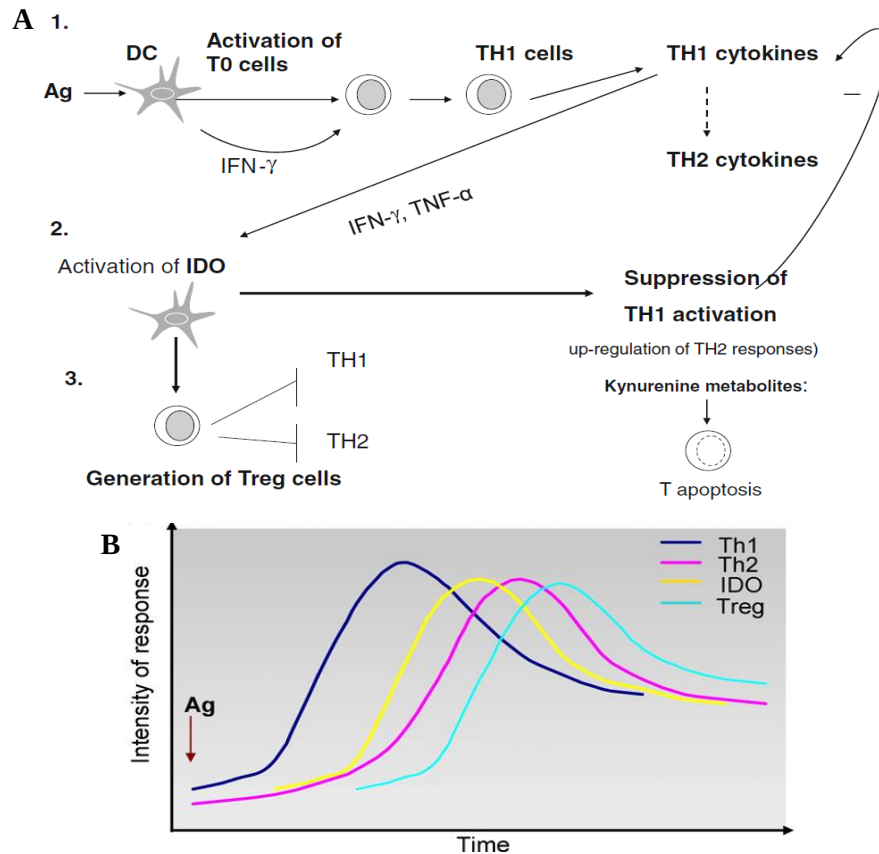


Figure 21 : Modèle de la régulation de la réponse T helper par la voie des kynurénines (Mándi and Vécsei, 2012; Xu et al., 2008a)

A. 1. La stimulation des DC entraîne une production d'IFN- γ par ces cellules et une réponse Th1. **2.** L'IFN- γ et le TNF- α produits par les Th1 induisent la production d'IDO par les DC. **3.** La voie des kynurénines induit une forte inhibition de la réponse Th1 et dans une moindre mesure de la réponse Th2, favorisant la réponse Th2. Parallèlement, la voie des kynurénines induit une réponse Treg qui inhibe les réponses Th1 et Th2. **B.** Modèle de la cinétique d'activation de l'IDO et des différentes populations de lymphocytes T helper.

Comme décrit précédemment, la déplétion en tryptophane et la production de métabolites de la voie des kynurénines induit une différenciation en Treg. La kynurénine induit la transcription de Foxp3 lors de l'activation des lymphocytes T naïfs (Mezrich et al., 2010). Parallèlement, la voie des kynurénines semble inhiber la différenciation en Th17 en favorisant la différenciation en Treg, de façon dépendante de l'IL-6. En effet, l'inhibition de l'IDO entraîne une augmentation de la production d'IL-6, nécessaire à la différenciation en Th17 en présence de TGF- β . Lorsque les cellules présentatrices d'antigène sont exposées au TGF- β , cela induit la production d'IDO, qui inhibe la production d'IL-6 et ainsi la différenciation en Th17 lors de la présentation de l'antigène, en favorisant ainsi la différenciation en Treg (Baban et al., 2009; Sharma et al., 2009). Ce phénomène est illustré chez les patients infectés par le VIH. Une corrélation inverse entre l'activité de l'IDO et le

ratio Th17/Treg a été mise en évidence. En effet, lorsque l'activité IDO est importante, il y a une diminution de la population Th17 et une augmentation de la population Treg (Favre et al., 2010; Jenabian et al., 2013). Le 3-hydroxy-anthranylate et la 3-hydroxy-kynurénine génèrent une diminution de la population Th17 et une augmentation de la population Treg (Favre et al., 2010). Par ailleurs, les lymphocytes Th17 expriment fortement la kynurénine-3-monooxygénase permettant la conversion de la kynurénine en 3-hydroxy-kynurénine et de l'anthranylate et 3-hydroxy-anthranylate, qui sont les deux métabolites favorisant la différenciation en Treg et défavorisant les Th17 (Stephens et al., 2013). La production de kynurénine-3-monooxygénase par les Th17 fait probablement partie des mécanismes d'autorégulation de la voie des kynurénines permettant de restreindre une réponse immunitaire excessive et de résoudre l'inflammation.

Comme il a été dit précédemment, le TGF- β induit la production d'IDO par les cellules présentatrices d'antigène, permettant de générer un environnement tolérogène (Belladonna et al., 2008, 2009). Le TGF- β , contrairement à l'IFN- γ , confère un phénotype immunorégulateur stable, permettant une tolérance des cellules présentatrices d'antigène sur le long terme (Pallotta et al., 2011).

A retenir :

- La déplétion en tryptophane et les métabolites de la voie des kynurénines inhibent la prolifération des lymphocytes T et induisent leur apoptose
- L'inhibition de la prolifération cible préférentiellement les lymphocytes activés
- Les Th1 sont plus sensibles aux métabolites de la voie des kynurénines que les Th2, générant un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur des Th2
- L'IDO favorise la différenciation en Treg au détriment des Th17 par l'induction de Foxp3 et l'inhibition de la production d'IL-6 par les cellules dendritiques
- L'IDO induit un phénotype tolérogène chez les cellules dendritiques

2.5 Rôle de la voie des kynurénines dans la réponse aux infections bactériennes

Le rôle de la voie des kynurénines dans la réponse aux infections bactériennes est schématisé dans la **Figure 22**.

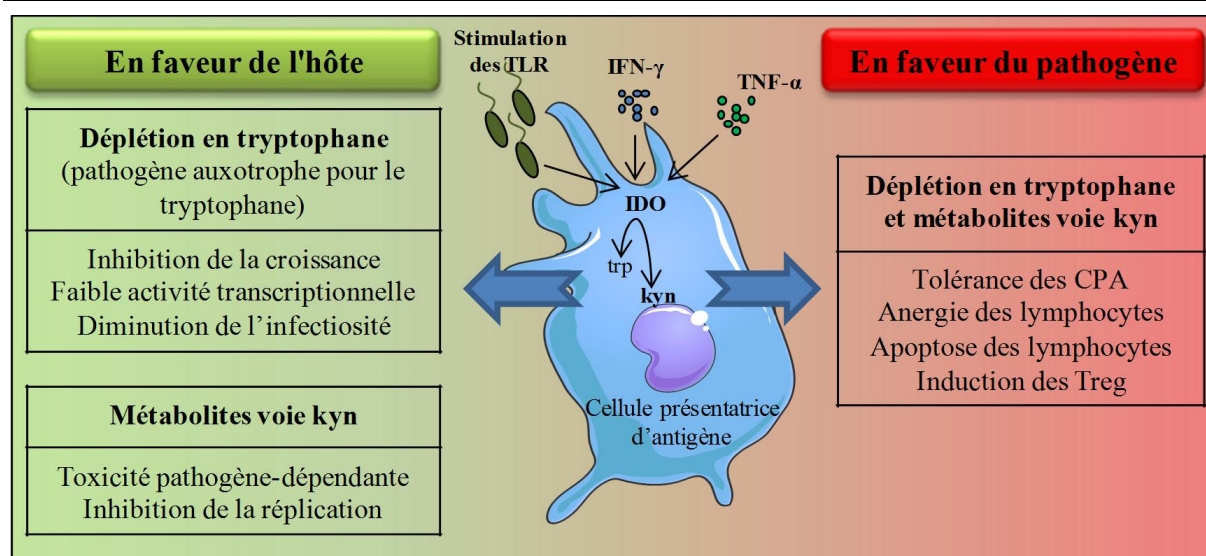


Figure 22 : Vue d'ensemble schématique du rôle de la voie des kynurénines dans la réponse aux infections bactériennes

Lors d'une infection bactérienne, la stimulation des TLR par les bactéries, l'IFN- γ et le TNF- α induisent la transcription de l'IDO et par conséquent la déplétion en tryptophane (trp) du microenvironnement et la production de métabolites de la voie des kynurénines. D'une part, cela peut entraîner un ralentissement du développement de l'infection. Pour les souches auxotrophes pour le tryptophane, cela a un effet bactériostatique et pour les souches prototrophes les métabolites de la voie des kynurénines ont une toxicité qui est dépendante du pathogène. D'autre part, la déplétion en tryptophane et les métabolites de la voie des kynurénines génèrent une tolérance du système immunitaire. Il doit donc y avoir une régulation fine de la voie des kynurénines afin d'éliminer le pathogène, sans induire une immunotolérance permettant la colonisation de l'hôte.

Lors d'une infection, il y a une reconnaissance des bactéries grâce aux TLR par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Il y a également une induction de la production et de la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'autres cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité. Ces facteurs pro-inflammatoires induisent la production d'IDO, entraînant la déplétion en tryptophane du microenvironnement et la production de métabolites de la voie des kynurénines.

La déplétion en tryptophane a un effet bactériostatique sur les bactéries auxotrophes pour cet acide aminé. La croissance et le métabolisme de ces bactéries sont inhibés, inhibant leur infectiosité. Pour les souches prototrophes, ce sont les métabolites de la voie des kynurénines qui peuvent avoir un effet toxique et inhiber leur croissance. Les différents métabolites de la voie des kynurénines ont des effets toxiques variés selon les métabolites et selon les pathogènes (Narui et al., 2009; Schmidt and Schultze, 2014). Par exemple, la voie des kynurénines joue un rôle clé dans le contrôle des infections par *Listeria monocytogenes* grâce à la production de kynurénine et de 3-hydroxy-kynurénine qui ont un effet toxique sur ce pathogène (Niño-Castro et al., 2014).

Comme cela a été exposé dans la partie précédente, la voie des kynurénines a également un impact important sur la régulation de l'immunité. Cela confère aux cellules dendritiques un phénotype tolérogène et induit une polarisation des macrophages vers un phénotype M2. Par ailleurs, la déplétion en tryptophane et les métabolites produits induisent l'anergie, voire l'apoptose des lymphocytes T effecteurs, ainsi qu'un phénotype Treg. Ceci entraîne une diminution de la réponse immunitaire, afin de résoudre l'inflammation. Cependant, si l'activation de la voie des kynurénines est déséquilibrée, cela peut favoriser la mise en place et la persistance d'une infection. C'est le cas lors d'une infection par *E. coli* uropathogène, qui induit la production d'IDO par les cellules épithéliales, affaiblissant ainsi la réponse immunitaire et permettant la colonisation urinaire par ces bactéries (Loughman and Hunstad, 2012).

A retenir :

- Lors d'une infection bactérienne la production d'IDO est induite
- La déplétion en tryptophane et les métabolites de la voie des kynurénines peuvent avoir un effet bactériostatique et bactéricide, inhibant l'infectiosité
- Ces phénomènes sont dépendants des pathogènes (auxotrophie et résistance aux métabolites de la voie des kynurénines)
- L'effet tolérogène de la voie des kynurénines sur l'immunité peut favoriser la mise en place et la persistance de l'infection

PARTIE IV : OBJECTIFS

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* possède une large gamme de facteurs de virulence, lui permettant aussi bien de s'adapter à son environnement que d'interagir avec les cellules de l'hôte. Parmi ceux-ci, il a été mis en avant que *P. aeruginosa* possède une voie du catabolisme oxydatif du tryptophane, la voie des kynurénines. Cette voie a principalement été étudiée comme étant une des voies de synthèse d'un facteur de virulence connu, le PQS. Par ailleurs, la voie des kynurénines a été largement étudiée chez l'hôte et est connue pour avoir un rôle majeur dans la régulation négative du système immunitaire. Des études préliminaires d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, par des souches produisant différents niveaux de kynurénine, ont déjà mis en avant un rôle de cette voie dans la virulence de *P. aeruginosa*. L'hypothèse émise par notre laboratoire est que cette voie des kynurénines, qui est commune à *P. aeruginosa* et à l'hôte, pourrait faire partie des mécanismes de dialogue inter-règnes permettant à la bactérie d'échapper au système immunitaire. En effet, la voie des kynurénines

de *P. aeruginosa* pourrait permettre à la bactérie d'influencer la réponse de l'hôte grâce aux métabolites produits.

Dans ce projet, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* dans l'interaction avec les cellules de l'immunité innée. Les neutrophiles et les macrophages jouent un rôle majeur dans la réponse contre les infections à *P. aeruginosa*. Cependant, chez les patients atteints de mucoviscidose, ces cellules échouent à éradiquer l'infection.

Dans un premier temps, nous avons mis au point des expériences d'interaction hôte/pathogène. Le but de ce travail a été d'étudier l'impact de la kynurénine de *P. aeruginosa* sur différents mécanismes de microbicidie des neutrophiles humains et sur la polarisation des macrophages issus de monocytes humains, pour mettre en évidence un nouveau mécanisme d'échappement au système immunitaire de cette bactérie. Pour confirmer les résultats obtenus, les neutrophiles et les macrophages ont été stimulés par différents agonistes en présence de kynurénine synthétique.

Dans un second temps, nous avons purifié et caractérisé la première enzyme de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*, dans le but de mieux comprendre la régulation de cette voie chez la bactérie. Par ailleurs, cette enzyme purifiée représente un nouvel outil pour réaliser un criblage de molécules thérapeutiques potentielles.

MATERIEL ET METHODES

PARTIE I : SOUCHES, PLASMIDES ET OLIGONUCLEOTIDES

1 Souches

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Liste des souches utilisées dans cette étude.

Souche ou plasmide	Caractéristiques	Source ou référence
<i>E. coli</i>		
DH5a	Cellules compétentes à la transformation	Invitrogen
S17-1	Souche donneuse pour la conjugaison biparentale	(Simon et al., 1983)
BL21	Souche d'expression des protéines recombinantes	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i>		
CHA / WT	Souche mucoïde isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose	(Toussaint et al., 1993)
$\Delta kynA$	Souche CHA délétée du gène <i>kynA</i>	(Shen et al., 2008)
$\Delta kynU$	Souche CHA délétée du gène <i>kynU</i>	(Genestet et al., 2014)
$\Delta kynA$ <i>pkynA</i>	Souche $\Delta kynA$ complémentée avec le plasmide <i>pkynA</i>	(Genestet et al., 2014)
(CHA) <i>pkynA::lux</i>	Souche CHA pourtant une fusion transcriptionnelle avec l'opéron <i>lux</i> sous contrôle du promoteur <i>kynA</i>	(Genestet et al., 2014)
$\Delta popBD$	Souche CHA délétée de l'opéron <i>popBD</i>	(Epaulard et al., 2006)
$\Delta popBD \Delta kynA$	Souche $\Delta popBD$ délétée du gène <i>kynA</i>	Cette étude
$\Delta popBD \Delta kynU$	Souche $\Delta popBD$ délétée du gène <i>kynU</i>	Cette étude
$\Delta popBD \Delta kynA$ <i>pkynA</i>	Souche $\Delta popBD \Delta kynA$ complémentée avec le plasmide <i>pkynA</i>	Cette étude

2 Plasmides

Les plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Plasmides utilisés dans cette étude.

*Kana^R : kanamycine resistance ; Amp^R : ampicillin resistance; Gm^R : gentamicine resistance; Tc^R : tetracycline resistance; Cb^R : carbénicilline resistance; KO : knock out

Plasmide	Caractéristiques*	Source ou référence
pTOPO	Vecteur de clonage bout-franc, Kana ^R	Invitrogen
pEX100Tlink	Vecteur suicide de remplacement allélique, Amp ^R (Cb ^R)	(Quénée et al., 2005)
pCM157	Plasmide portant la séquence codant pour la Cre recombinase, Tc ^R	(Marx and Lidstrom, 2002)
pUCGmlox	Vecteur contenant le gène <i>aacC1</i> flanqué des séquences <i>lox</i> , Amp ^R , Gm ^R	(Quénée et al., 2005)
pKO- <i>kynA</i>	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamicine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynA</i> , Amp ^R , Gm ^R	(Shen et al., 2008)
pKO- <i>kynU</i>	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamicine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynU</i> , Amp ^R , Gm ^R	(Genestet et al., 2014)

Plasmide	Caractéristiques*	Source ou référence
pKO-popBD	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamicine encadrée par deux séquences lox et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>popBD</i> , Amp ^R , Gm ^R	(Epaulard et al., 2006)
pUCP20	Vecteur de clonage, mobilisable dans <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> , Amp ^R (Cb ^R)	(West et al., 1994)
pkynA	Vecteur dérivé du plasmide pUCP20 contenant le cadre de lecture du gène <i>kynA</i> , Amp ^R (Cb ^R)	(Genestet et al., 2014)
Mini-CTX-lux	Mini-CTX-lux, Tc ^R	(Laskowski et al., 2004)
Mini-CTX-pkynA::lux	Contient l'opéron <i>luxCDABE</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>kynA</i>	(Genestet et al., 2014)
pFLP2	Plasmide portant la séquence codant pour la Flp recombinase, Amp ^R (Cb ^R)	(Hoang et al., 1998)
pET15b	Plasmide de surexpression, promoteur T7, tag 6His en N-terminal, Amp ^R	Novagen
pET15b-kynA	Vecteur dérivé du plasmide pET15b contenant le gène <i>kynA</i> , cloné Nde1/Xho1	Cette étude

3 Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau **Tableau 4**.

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Nom	Séquences*	Description
kynA-U1 kynA-U2	5'-AGAGCTCTGCTCAACGGCGGCGGAAAGCGTT-3' 5'-TAAGCTTCTCTCCGTCCGTTTCTCCCTG-3'	Amplification de la région en amont du gène <i>kynA</i>
kynA-D1 kynA-D2	5'-TAAGCTTAGCATGCTCGATACCATCCTC-3' 5'-AGGATCCATCGACCAACGCCTGATCAA-3'	Amplification de la région en aval du gène <i>kynA</i>
kynA-1 kynA-2	5'-TACCGTCGCTGCCTACCAGGC-3' 5'-CATGGGGCTTTTGGCGCAAGA-3'	Vérification de Δ <i>kynA</i>
kynA-C1 kynA-C2	5'-TCGAGCTCGTGTCCTTGCCCTCACTCC-3' 5'-GAGGATCCCTACAGGTGGAACGGAGCC-3'	Amplification du cadre de lecture du gène <i>kynA</i> pour la complémentation
kynU-U1 kynU-U2	5'-AGAGCTCGATGGCGTCCAGGGACA-3' 5'-TAAGCTTGCCGTCGAGGTAGATCAC-3'	Amplification de la région en amont du gène <i>kynU</i>
kynU-D1 kynU-D2	5'-TAAGCTTCGAGCATGCCAGG-3' 5'-ATCTAGAACACCACAGGCGCAC-3'	Amplification de la région en aval du gène <i>kynU</i>
kynU-1 kynU-2	5'-CGACTGCCTGGCGCTCGA-3' 5'-TTGTGCCGGACCTGGTAGC-3'	Vérification de Δ <i>kynU</i>
pkynA-F pkynA-R	5'-TAAGCTTCGCTGGATGGAGTGG-3' 5'-AAGATCTCTCCGGCGGCAGGCGTC-3'	Amplification du promoteur <i>kynA</i>
kynA-F kynA-R	5'-GCATATGGGCGCATCGTAAAA-3' 5'-CCTCGAGCGCGTTGAATTGAAC-3'	Amplification du gène <i>kynA</i>

* Les zones soulignées correspondent aux sites de restriction.

PARTIE II : CULTURE BACTERIENNE

1 Milieux de culture et antibiotiques

Luria-Bertani (milieu LB) :

Composants	Quantités pour 1 L
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	Qsp 1 L

Tamponné à pH 7 et stérilisé par autoclavage.

Pour 1 L du milieu LB gélosé, 15 g d'agar sont ajoutés.

Pseudomonas Isolation Agar (milieu PIA) :

Composants	Quantités pour 1L
Poudre PIA (Difco laboratories)	45 g
Glycérol	20 mL
H ₂ O	Qsp 1 L

Stérilisation par autoclavage.

Milieu M9 modifié (M9M) (Wang et al., 2012) :

Composants	Concentration
Extrait de levure	4 g/L
Tryptophane	204 mg/mL (1 mM)
Glucose	2,5 g/L
Glycérol	1 %
FeSO ₄	400 mg/L
Acide citrique	590 mg/L
Mg Salts Medium 5X	11,28 g/L
MgCl ₂	203 mg/L
CaCl ₂	147 mg/L
H ₂ O	Qsp 1 L

Le milieu est mis sous agitation 2 à 3h en chauffant à 50-60°C, puis filtré à l'aide d'un filtre de porosité 0,22 µm.

Antibiotiques utilisés :

	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Liquide	Gélose	Liquide	Gélose
Tétracycline	20 µg/mL	20 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
Gentamicine	10 µg/mL	10 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Carbénicilline	--	--	300 µg/mL	600 µg/mL
Ampicilline	100 µg/mL	100 µg/mL	--	--
Kanamycine	50 µg/mL	50 µg/mL	--	--

2 Culture de *P. aeruginosa*

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

La souche de *P. aeruginosa* du laboratoire est la souche CHA (Toussaint et al., 1993). Elle a été isolée au CHU de Grenoble, à partir d'un lavage broncho-alvéolaire de patient atteint de mucoviscidose. Cette souche adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire et possède un système de sécrétion de type III (SST3) actif *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, et *in vitro*, par une déplétion du milieu en calcium ou un contact cellulaire. Elle dispose des gènes codant les exotoxines du SST3 : ExoS, ExoT, ExoY, mais ne possède pas le gène codant ExoU.

Son phénotype de résistance aux antibiotiques est celui d'une souche sauvage, n'ayant pas acquis de modes de résistance supplémentaires : pas de résistance aux carboxypénicillines; pas de résistance aux autres aminosides comme la kanamycine et pas de résistance à la tétracycline. En milieu liquide, *P. aeruginosa* peut être cultivée à 37°C en milieu riche (milieu de Luria Bertani, dit LB) ou en milieu M9M sous agitation (250 rpm). En milieu solide, elle peut être cultivée en milieu LB supplémenté en agar, ou en milieu Pseudomonas Isolation Agar (PIA).

3 Culture de *Escherichia coli*

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

4 Suivi de la croissance et densité bactérienne

La croissance des bactéries est mesurée par la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de la culture à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 10, Cell Density Meter, Amersham Biosciences). Une unité de DO correspond à $8 \cdot 10^8$ bactéries/mL pour *E. coli* et $5 \cdot 10^8$ bactéries/mL pour les souches de *P. aeruginosa*.

5 Conservation des souches bactériennes

Les souches de *E. coli* sont conservées à -80°C dans du milieu de culture additionné de glycérol 40 % (v/v). Les souches de *P. aeruginosa* sont conservées également à - 80°C sur des supports microbilles (Protect Bacterial Preservers; Technical Service Consultants) inoculées à partir de culture sur gélose.

6 Traitement des bactéries à l'H₂O₂

Dans le but d'étudier le rôle de la voie des kynurénines dans la résistance des bactéries au peroxyde d'hydrogène, des traitements des bactéries à l'H₂O₂ ont été réalisés en milieux liquides et solides.

6.1 *Traitement des bactéries à l'H₂O₂ en milieu solide*

Après une culture sur la nuit, la concentration en bactéries est ajustée à une DO₆₀₀ de 0,1 puis 100 µL sont étalés sur LB agar. Un disque stérile de 10 mm (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) est placé au centre de la boîte puis est imbibé par 8 µL d'H₂O₂ 30 % (v/v). Les boîtes de Petri sont incubées 36h à 25°C puis le diamètre d'inhibition est mesuré pour déterminer la résistance des différentes souches de *P. aeruginosa* au peroxyde d'hydrogène (Polack et al., 1996).

6.2 *Traitement des bactéries à l'H₂O₂ en milieu liquide*

Les différentes souches de *P. aeruginosa* sont mises en culture à un DO₆₀₀ initiale de 0,2. Une fois en phase exponentielle (DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,6), toutes les 10 minutes pendant 1h, 1 mM d'H₂O₂ (ou de l'H₂O pour le contrôle) sont ajoutés dans le milieu de culture (c'est-à-dire six fois 1mM, donc 6 mM final). Cette méthode permet de reproduire de façon plus physiologique l'interaction avec les neutrophiles avec une augmentation progressive de la concentration en peroxyde d'hydrogène (Khakimova et al., 2013). Après 1h de "pulse" d'H₂O₂, des dilutions en série sont effectuées en PBS et étalées en duplicat sur milieu PIA. Les UFC (unité formant colonie) sont dénombrées après une nuit d'incubation à 37°C. Le pourcentage de bactéries viables est calculé par rapport au nombre d'UFC de la condition contrôle.

PARTIE III : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1 Préparation d'ADN génomique

Après une culture de 16 heures dans 2 mL de milieu riche, les bactéries sont centrifugées 5 min à 10000 *g*. La purification de l'ADN génomique est réalisée en suivant les instructions du kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France).

2 Préparation d'ADN plasmidique

La technique dite de "miniprep" permet une extraction et une purification d'ADN plasmidique rapide et simple à partir d'une culture liquide. Après une culture de 16 h dans 2 mL de milieu riche, les bactéries sont centrifugées 5 min à 10000 *g*. La purification de l'ADN plasmidique est réalisée en suivant les instructions du kit QIAprep Miniprep (Qiagen, Courtaboeuf, France).

3 Electrophorèse d'ADN

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

4 Extraction des fragments d'ADN

Après migration de l'ADN dans un gel d'agarose, le fragment d'intérêt est découpé rapidement sur table UV afin d'éviter d'éventuelles mutations. L'extraction est réalisée en suivant les instructions du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'agarose est dissout en incubant le fragment d'intérêt 10-15 min à 55°C dans 200 µL du

tampon adéquat pour 100 mg de gel. L'ADN est ensuite piégé par une matrice de silice, lavé avec une solution contenant de l'éthanol, puis élué avec un tampon d'élution ou de l'eau.

5 Quantification des acides nucléiques

La quantité d'ADN d'un échantillon a été évaluée après migration en gel d'agarose, puis coloration par le BET. La quantité de fluorescence émise par le BET est proportionnelle à la masse totale de l'ADN. La quantité d'ADN dans l'échantillon est estimée en comparant le niveau de fluorescence de l'échantillon à celui du marqueur de poids moléculaire. 1 à 5 ng peuvent être détectés par cette méthode.

6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

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

1 - Dénaturation de l'ADN double brin, 95°C de 45 secondes à 5 min

2 - Hybridation des amorces sur la matrice à $T_m-4^{\circ}\text{C}$, 45 secondes.

La température d'hybridation (T_m) dépend de la richesse en bases C et G des amorces et de leur degré de complémentarité avec la matrice. Elle se calcule selon la formule suivante (basée sur la séquence commune à l'amorce et à la matrice) : $T_m = 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})$. Idéalement, la taille des amorces doit être comprise entre 18 et 25 bases et la T_m entre 57 et 63°C. De plus, il faut privilégier la présence de quelques bases C ou G en 3' pour avoir une bonne initiation de la polymérisation.

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

Le mélange réactionnel est composé de :

Réactifs	Concentration
ADN matrice	10 à 100 ng
Amorce sens	0,3 μM
Amorce anti-sens	0,3 μM
dNTP	0,2 mM de chaque
Tampon de polymérase	1X
Polymérase	2,5 U (Taq) / 1,25 U (Pfu)
Eau	Qsp 50 μL

Pour la PCR sur colonie bactérienne, une colonie est prélevée et mis en suspension dans 100 μ L d'eau stérile. La suspension est chauffée à 95°C pendant 5 min afin de lyser les cellules et est utilisée comme ADN matrice.

Cette amplification est essentiellement utilisée à deux fins : disposer d'une séquence pour un clonage ou détecter un événement : présence d'une séquence, taille d'une séquence (par exemple après une délétion) ...etc. Pour les clonages des fragments de PCR, des sites de restriction sont rajoutés aux extrémités des amorces. Deux températures d'hybridation sont alors utilisées. La première est calculée sans tenir compte des séquences des sites de restriction rajoutées qui ne s'hybrident pas à la matrice (entraînant une température d'hybridation plus basse), 5 cycles de synthèse sont alors effectués en début de réaction avec celle-ci. Puis 30 cycles sont effectués avec la seconde température d'hybridation correspondant à la totalité de la longueur des amorces.

7 Restriction de l'ADN

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN sont des endonucléases bactériennes, coupant le double brin d'ADN en un point précis. Une enzyme de restriction est caractérisée par la séquence du site reconnu, et la position de la coupure. Une séquence comprise dans un plasmide peut ainsi être excisée pour être clonée, ou être remplacée...etc. Les enzymes sont utilisées suivant les instructions des fabricants (Roche, Invitrogen, Promega, ...) à des concentrations de 1 à 2 U/ μ g d'ADN/heure. Les conditions d'incubation peuvent varier selon l'enzyme, mais la plupart ont une activité optimale à 37°C. La digestion peut être vérifiée par une migration sur gel d'agarose.

8 Clonage

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

8.1 *Sous clonage*

Cette étape est utilisée pour disposer en quantités importantes d'un fragment d'ADN encadré par les sites de restriction voulus. Le système utilisé dans ce travail est le système Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit® (Invitrogen, Oregon, USA) pour le clonage des

fragments de PCR à bouts francs (générés par la Pfu) et se réalise selon le protocole du fabriquant du kit.

8.2 Ligation

On utilise habituellement la T4 ligase (Roche). Les fragments en présence ont soit des extrémités cohésives générées par la même enzyme de restriction (ce qui facilite la ligation), soit tout deux des extrémités franches (ce qui diminue le rendement de la réaction). L'obtention d'extrémités franches est un préalable si les extrémités à fusionner n'ont pas été générées par la même enzyme. Ici, la ligation a été réalisée en incubant l'insert et le vecteur à un ratio de 3:1 avec la T4 ligase pendant 10 min à température ambiante, puis 5 min sur glace, avant de transformer le produit de ligation dans les bactéries compétentes.

9 Transformation

9.1 Choc thermique

La transformation est réalisée en ajoutant 3 à 5 µL de solution contenant le plasmide, ou de la solution de ligation, à 100µL de suspension de bactéries compétentes DH5α, immédiatement après décongélation. Après 30 min d'incubation dans la glace, un choc thermique des bactéries de 45 secondes à 42°C est réalisé. Après 2 min de refroidissement dans la glace, 400 µL du milieu LB sont ajoutés et les bactéries transformées sont incubées à 37°C pendant 1h sous agitation (250 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection et incubées à 37°C.

9.2 Electroporation

La transfection d'un vecteur dans *P. aeruginosa* par électroporation consiste à rendre les cellules perméables à l'ADN au moyen d'une décharge électrique. La technique d'Enderle et Farwell est utilisée afin de préparer des cellules électrocompétentes (Enderle and Farwell, 1998). Ici, les bactéries ont été rendues compétentes à l'électroporation par lavages successifs en milieu liquide contenant 300 mM de saccharose (Choi et al., 2006). Une culture liquide de 16 h est utilisée, les bactéries sont lavées deux fois dans de l'eau stérile contenant 300 mM de saccharose puis remises en suspension dans la même solution. Après cette étape, 100 µL de bactéries sont incubées 30 min dans la glace avec environ 25 ng d'ADN plasmidique, puis soumises à l'électroporation. Cette dernière est réalisée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie à -20°C sur laquelle est appliquée une décharge de 1800 V pendant 5

millisecondes (appareil Electro Cell Manipulator ECM 399, BTX, Genetronic Inc, San Diego, CA). Le mélange est repris dans 400 µL de milieu LB puis incubé 1 h à 37°C sous agitation (250 rpm). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu PIA ou LB contenant l'antibiotique approprié.

10 Mutagenèse par échange allélique chez *P. aeruginosa*

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

10.1 *Echange allélique*

Les fragments de 1 à 2 kb, correspondant aux séquences flanquantes 5' et 3' du gène d'intérêt, sont d'abord clonés dans le vecteur pEX100Tlink, puis la cassette *aacC1* conférant une résistance à la gentamicine est insérée entre ces deux fragments. Cette cassette est flanquée de deux courtes séquences nucléotidiques, *loxP*, reconnues par la recombinaise Cre qui permettra d'exciser le gène de résistance *aacC1* une fois la double recombinaison réalisée. Ce vecteur est ensuite transféré dans la souche de *P. aeruginosa* par conjugaison biparentale.

10.2 *Conjugaison biparentale*

La conjugaison biparentale est réalisée avec la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le vecteur d'échange allélique. La souche de *E. coli* et la souche de *P. aeruginosa* sont cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis mélangées et déposées, sans étalement, sur le milieu LB gélosé sans NaCl. Après une nuit à 37°C, la culture est reprise dans 1 mL du milieu LB et étalée sur le milieu PIA contenant de la gentamicine. Le vecteur pEX100Tlink ne pouvant se répliquer dans *P. aeruginosa*, seules les souches ayant intégré la cassette *aacC1* par simple ou double recombinaison homologue entre les séquences flanquantes du gène d'intérêt pourront se développer sur ce milieu.

10.3 Sélection des clones double recombinants

L'événement de recombinaison peut être simple ou double. Une simple recombinaison, entre une séquence flanquante du gène d'intérêt au niveau du plasmide et son homologue génomique entraîne l'insertion complète du plasmide pEX100Tlink, incluant les gènes *bla* et *sacB*, dans le génome. Chez ces clones simples recombinants (SR), le gène d'intérêt est reconstitué et non invalidé. Lors d'un événement de double recombinaison homologue, un pour chaque partie flanquante du gène, le gène d'intérêt est remplacé par la cassette *aacC1* sans incorporation des gènes *bla* et *sacB* dans le génome. Ce sont ces clones doubles recombinants (DR) qui sont les clones d'intérêt. En premier lieu, les clones recombinants, ayant incorporé dans leur génome la cassette *aacC1*, sont sélectionnés sur milieu PIA contenant de la gentamicine. La proportion de clones DR obtenue ensuite est variable selon le gène ciblé, en raison des différents niveaux de compaction de l'ADN qui rendent des zones du génome plus ou moins accessible à la recombinaison. Ensuite, les colonies sont contre-sélectionnées sur le milieu PIA avec 5 % du saccharose grâce au gène *sacB*. Du fait de la toxicité qu'entraîne la présence de ce gène sur ce milieu, seuls les clones ayant éliminé *sacB* pourront se développer. Ceci se produit soit par réversion du premier événement de recombinaison, soit par un second événement de recombinaison conduisant à un clone DR. Ces clones contre-sélectionnés sont ensuite repiqués sur milieu PIA gentamicine pour éliminer les révertants et sur PIA carbénicilline afin de sélectionner les clones DR. Ces mutants par insertion/délétion, avec un profil double recombinant, sont ensuite vérifiés par PCR à partir d'un extrait d'ADN génomique.

10.4 Excision de la cassette de résistance

Les clones DR sont transformées par électroporation avec le plasmide pCM157 portant un gène de résistance à la tétracycline et le gène codant la recombinase Cre. Cette enzyme reconnaît la séquence *loxP* et entraîne une délétion par une recombinaison entre deux sites *loxP*. Les clones transformants sélectionnés sur tétracycline sont ensuite cultivés en milieu LB liquide supplémenté en tétracycline afin de permettre l'expression de l'enzyme Cre et l'élimination du gène *aacC1*. Le plasmide pCM157 est ensuite éliminé en réalisant plusieurs cultures en milieu LB liquide sans antibiotique. Enfin, les colonies sont repiquées sur milieu PIA, PIA tétracycline pour vérifier que le plasmide a été éliminé et sur milieu PIA gentamicine afin de sélectionner les clones ne possédant plus la cassette *aacC1* (**Figure 23**). L'excision de ce gène est vérifiée par PCR à partir d'un extrait d'ADN génomique de ces mutants.

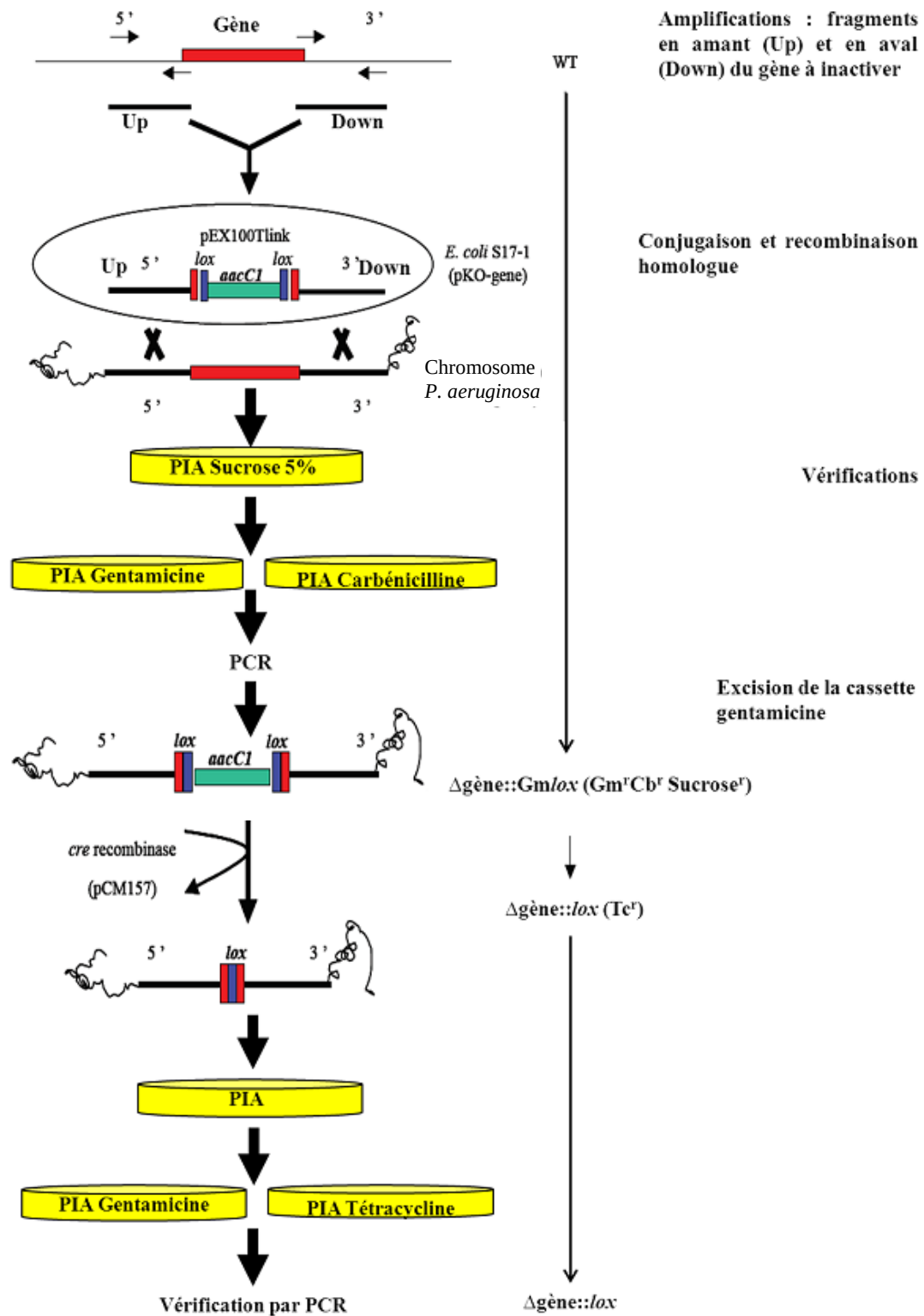


Figure 23 : Procédure d'inactivation des gènes par le système cre-lox.

11 Insertion d'une fusion transcriptionnelle rapportrice dans le chromosome

Afin d'étudier le niveau de transcription de certains gènes, la technique développée par Laskowski (Laskowski et al., 2004) et Schweizer (Becher and Schweizer, 2000) a été utilisée pour réaliser des constructions rapportrices. En effet, le plasmide miniCTX-pgène-lux contenant le promoteur du gène d'intérêt (pgène) a été mobilisé dans la souche de *P. aeruginosa* par conjugaison. Après intégration dans le chromosome, le reste du plasmide est excisé par la Flp recombinase comme décrit précédemment (**Figure 24**) (Hoang et al., 1998). Chaque construction rapportrice est présente en une seule copie intégrée dans le site *attB* du chromosome bactérien (Laskowski et al., 2004).

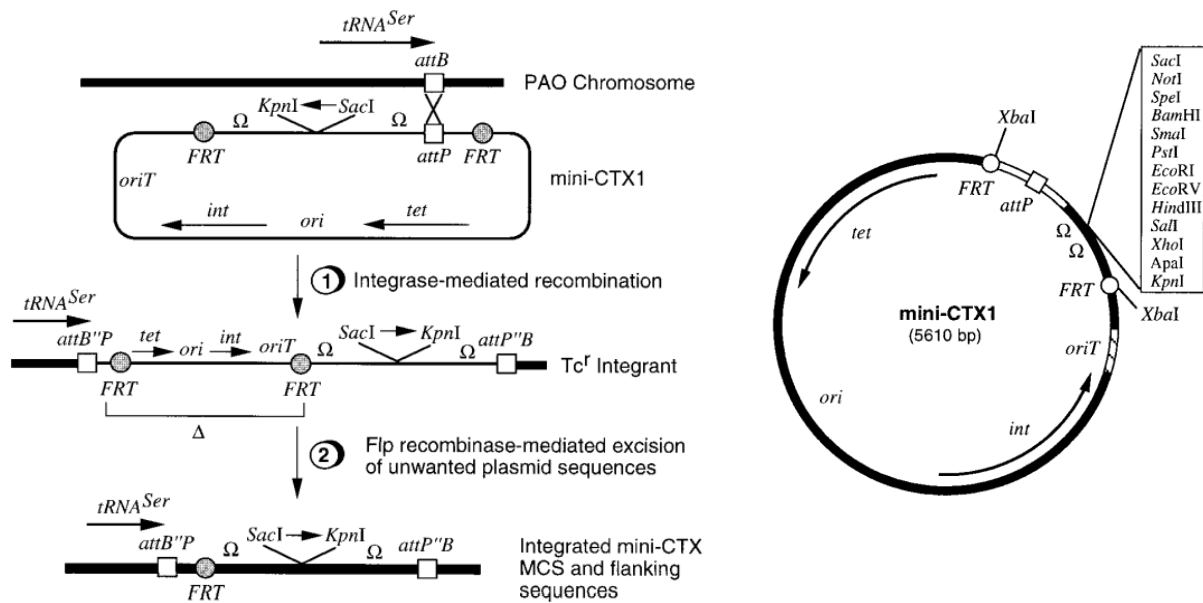


Figure 24 : Construction des fusions transcriptionnelles rapportrices (D'après Hoang et al., 1998).

L'analyse de l'activité transcriptionnelle du gène *kynA* a été réalisée par mesure de la bioluminescence émise par les bactéries possédant l'opéron *luxCDABE*. Le promoteur du gène *kynA* a été fusionné en amont de l'opéron *luxCDABE* sans promoteur donnant le plasmide mini-CTX-*pkynA::lux*. Le gène rapporteur a ensuite été transféré dans le chromosome de la souche sauvage de *P. aeruginosa* au niveau du gène *attB* par recombinaison homologue. Ceci signifie que lorsqu'il y a activation transcriptionnelle du gène d'intérêt, les bactéries *pkynA::lux* produisent des photons.

La luminescence est mesurée par un luminomètre (Mithras LB 940, Berthold Technologies) et des prélèvements et des dilutions en cascade sont réalisés afin d'effectuer un dénombrement des bactéries. Les unités relatives de luminescence (URL) de la culture, rapportées au nombre d'UFC, permettent d'estimer l'activité transcriptionnelle du promoteur.

12 Complémentation des mutants

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

PARTIE IV : TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

1 Production et purification de l'enzyme recombinante KynA

1.1 Production de la protéine recombinante KynA

Les bactéries BL21, transformées par la construction plasmidique pET15b-KynA-NdeI/XhoI, sont mises en culture à une DO₆₀₀ initiale de 0,2 dans du milieu LB plus ampicilline 100 µg/mL à 37°C sous agitation. A une DO₆₀₀ comprise entre 0,6 et 0,8, c'est-à-dire en phase exponentielle, l'expression de la protéine recombinante KynA est induite par de l'IPTG 1 mM, puis les bactéries sont incubées pendant 20h à 16°C sous agitation.

1.2 Purification de la protéine recombinante KynA

La purification de KynA a été adaptée d'une méthode précédemment décrite (Capece et al., 2011). Les bactéries sont centrifugées 20 min à 5000 rpm et resuspendues dans du tampon de lyse [fast break lysis reagent 1X (Promega), cocktail d'inhibiteur de protéase EDTA-free (Roche), DNase 1X (Roche)]. Après 15 min d'incubation sous agitation légère à température ambiante, les bactéries sont congelées à -20°C. Après décongélation les débris cellulaires sont éliminés par 20 min de centrifugation à 15000 rpm.

La fraction soluble est récupérée pour la purification de la protéine recombinante KynA par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel NiNTA superflow (Qiagen, Courtaboeuf, France) à 4°C. Après deux passages de la fraction soluble à 1 mL/min, la colonne de nickel est lavée par du tampon Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM contenant 10 mM de L-tryptophane, 5 % de glycérol et 50 mM d'imidazole. La protéine KynA est éluée par du tampon Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM contenant 10 mM de L-tryptophane, 5 % de glycérol, 0,5 mM de ferricyanure de potassium et 300 mM d'imidazole. Le L-tryptophane et le glycérol permettent de stabiliser la protéine. Le ferricyanure de potassium permet à la protéine KynA d'être sous forme oxydée, à l'état ferrique. Pour éliminer le L-tryptophane, le glycérol et l'imidazole, les fractions d'élution sont dialysées trois fois 1h dans 2L de PBS concentré en NaCl (420mM) contenant 0,5 mM de ferricyanure de potassium (Yuasa et al., 2011). Pour finir, la protéine KynA est conservée à -80°C. A chaque étape de la purification, des aliquots sont récupérés afin d'analyser la pureté des échantillons par gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 12 % et par Western blot.

2 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est un test colorimétrique basé sur la fixation du bleu de Coomassie en milieu acide sur les groupements amines libres des protéines. La longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie évolue de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est complexé à un groupement amine (Bradford, 1976). Cette technique simple permet de doser de faibles quantités de protéines dans des milieux à forte salinité. L'absorbance du complexe à 595 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Elle est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA). Les échantillons et la gamme de BSA sont ajoutés à 1 mL de réactif de Bradford (BioRad protein Assay, Ready to Use) et incubés au minimum 5 min à température ambiante. La mesure de l'absorbance doit être réalisée dans les 30 min suivantes (période de stabilité de la coloration).

3 Séparation des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

3.1 Principe

La technique d'électrophorèse SDS-PAGE permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli and Favre, 1973). A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique. Cette propriété leur

permet de migrer au sein d'un champ électrique. Dans cette technique, les protéines sont préalablement incubées avec l'agent réducteur β -mercaptoéthanol (sauf dans le cas d'un gel en condition non dénaturantes), qui rompt les ponts disulfures, et du SDS, qui dénature les protéines, de telle sorte à conférer une charge uniquement négative aux protéines. Dès lors, les protéines vont migrer dans la même direction au travers d'un gel de polyacrylamide et ne seront séparées qu'en fonction de leur masse moléculaire. Le choix du pourcentage de polyacrylamide du gel dépend de la taille de la protéine d'intérêt que l'on veut séparer. En effet, plus le maillage est dense (haut pourcentage) plus la migration est lente, permettant une meilleure séparation des protéines de petite taille.

3.2 Préparation des gels de polyacrylamide

Les quantités indiquées correspondent à la préparation de deux mini-gels (9 cm x 6,5 cm) de 1 mm d'épaisseur.

	Gel de séparation		Gel de concentration
Réactifs	Gel 12 %	Gel 8 %	
H ₂ O	10,4 mL	12,8 mL	6,32 mL
Tris-HCL 1,5M pH 8,9	6,0 mL	6,0 mL	
Tris-HCL 0,5M pH 6,6			2,5 mL
Acrylamide 40 %	7,2 mL	4,8 mL	1,0 mL
SDS 10 %	240 μ L	240 μ L	100 μ L
APS 10 %	150 μ L	150 μ L	70 μ L
TEMED	25 μ L	25 μ L	10 μ L

3.3 Préparation des échantillons et migration par électrophorèse

Les échantillons sont ajoutés à du tampon de dépôt [Tris-HCl 250 mM, bleu de bromophénol 0,004 % (v/v), SDS 2 % (p/v), sucrose 4 % (p/v)] contenant ou non 2,5 % (v/v) de β -mercaptoéthanol. Les protéines sont dénaturées à 25°C pendant 2h ou à 95°C pendant 3 min. La migration des protéines s'effectue en 1h environ à 150 V, dans un tampon de migration à pH 8,8 [Tris 25 mM, Glycine 190 mM, SDS 0,1 % (p/v)].

3.4 Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les protéines peuvent être révélées par coloration au bleu de Coomassie (détection d'environ 1 μ g de protéines). Le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie [bleu de Coomassie 0,25 % (p/v), acide acétique 10 % (v/v), méthanol 50 % (v/v)] pendant 10 à 30 min sous agitation. L'excès de colorant est éliminé par des bains successifs dans une solution de décoloration [éthanol 26 % (v/v) et acide acétique 7 % (v/v)].

4 Western blot

4.1 *Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose*

Afin d'identifier les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE à l'aide d'anticorps spécifiques, elles sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,45 μm) en système de transfert semi-sec. Dans ce cas, le gel SDS-PAGE ne doit pas être coloré au bleu de Coomassie. La cuve de transfert, constituée de deux électrodes de graphite, est soigneusement humidifiée par du tampon de transfert à pH 8,3 [Tris 25 mM, Glycine 129 mM, SDS 0,01 % (p/v), méthanol 20 % (v/v)]. Le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose "en sandwich" entre six feuilles de papiers Whatman n°3, l'ensemble étant préalablement imprégné de tampon de transfert. Ainsi, les protéines chargées négativement migrent de la cathode vers l'anode et s'adsorbent sur la membrane. Le transfert est réalisé à raison de 50mA par mini-gel à transférer durant 1h pour un gel de 1mm d'épaisseur.

4.2 *Révélation des protéines*

Après transfert, les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés par une incubation sous agitation douce pendant 1h30 dans du tampon TBS-Tween pH 7,5 [Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 0,05 % (v/v)] supplémenté en lait écrémé en poudre 5 % (p/v). La membrane est ensuite lavée à trois reprises durant 5 min en TBS-Tween. Elle est alors incubée en TBS-Tween lait écrémé 1 % (p/v) pendant 1h30 à température ambiante sous agitation lente en présence de l'anticorps anti-His couplé à l'enzyme peroxydase HRPO (horse radish peroxidase), ce qui permet une révélation par chemiluminescence (kit ECL Western blotting, Rockland). La chemiluminescence obtenue résulte d'une dissipation d'énergie du luminol, excité suite à son oxydation catalysée par le système HRPO/H₂O₂ dans des conditions alcalines. La lumière émise par le retour du luminol à un état basal d'excitation est intensifiée grâce à des composés phénols et captée sur film autoradiographique.

5 Test d'activité de l'enzyme recombinante purifiée KynA

5.1 *Cinétique enzymatique*

Le tampon de réaction servant à réaliser la cinétique de l'activité enzymatique de la protéine recombinante KynA contient 20 mM de L-ascorbate (un agent réducteur permettant d'avoir l'enzyme sous sa forme ferreuse), des concentrations croissantes en L-tryptophane (réalisées par dilution en cascade à l'aide d'une solution mère à 55mM) dilués dans du tampon potassium phosphate 0,1 M pH 7,4. 900 μL de cette solution sont incubés 5 min à

37°C, puis la réaction est initiée par l'ajout de 100 µL de l'enzyme à une concentration de 7 µM. L'activité catalytique de KynA a été déterminée en mesurant la vitesse de formation du produit à 321 nm sur les quatre premières minutes de la cinétique ($\epsilon = 3750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour la N-formyl-kynurénine) (Capece et al., 2011; Zhang et al., 2007).

5.2 Test d'inhibiteurs potentiels

Les inhibiteurs potentiels testés sont le L et le D 1-méthyl-tryptophane (L ou D-1MT) car il s'agit d'analogues non métabolisables du substrat (le L-tryptophane). De plus, des études ont déjà montré un effet inhibiteur sur l'homologue fonctionnel chez l'homme : l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) (Ibana et al., 2011; Opitz et al., 2011).

Pour tester l'effet de ces stéréoisomères sur l'activité catalytique de la protéine recombinante KynA, différentes concentrations ont été ajoutées au tampon de réaction (solutions mères de L et D-1MT à 10 mM). Comme précédemment, la réaction a été initiée par l'ajout de l'enzyme et l'activité catalytique a été déterminée en mesurant la vitesse de formation du produit à 321 nm sur les quatre premières minutes de la cinétique (Yuasa et al., 2011).

6 Dosage colorimétrique de la production de kynurénine par *P. aeruginosa*

Afin de doser les kynurénines et notamment la L-kynurénine accumulée dans le surnageant des cultures bactériennes, le réactif d'Ehrlich Kovac (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) est utilisé (Boyanova et al., 2002). Ce dernier contient du n-butanol, de l'acide chlorhydrique et du diméthylamino-4-benzaldéhyde et est utilisé dans la recherche d'indole. Après une centrifugation à 10 000 g, le surnageant bactérien est récupéré et 100 µL sont mélangés avec 100 µL du réactif d'Ehrlich Kovac. Après 10 min d'incubation à l'abri de la lumière, à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 490 nm. À l'aide d'une gamme de kynurénine synthétique, la concentration de kynurénine produite dans le surnageant est déterminée. Le milieu de culture est utilisé comme contrôle négatif.

7 Production d'anions superoxydes en système non-enzymatique

La génération d' O_2^- se fait par l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) en présence de phénazine methosulfate (PMS) et de l'oxygène moléculaire. Cette réaction est couplée à la réduction de nitro bleu de tétrazolium (NBT) en formazan qui absorbe à 560 nm

(Figure 25). Cette méthode peut servir à évaluer l'effet "scavenger" de molécules comme la kynurénine.

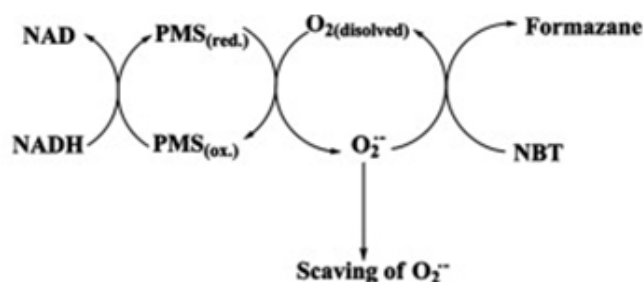


Figure 25 : Mécanisme du système PMS-NADH-NBT

Le protocole suivant a été adapté d'une méthode précédemment décrite (Khalil et al., 2008). Le milieu réactionnel est composé de tampon potassium phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant du NBT 100 μ M, du NADH 150 μ M et des concentrations croissantes en "scavenger" potentiel. La génération d'O₂^{•-} est induite par l'ajout de 30 μ M de PMS. Après 3 min d'incubation à 25°C, l'absorbance à 560 nm est mesurée. Le N-acétyl-cystéine, un antioxydant connu, a servi de standard (Lugo-Huitrón et al., 2011). L'effet "scavenger" est traduit en pourcentage d'inhibition de la formation de formazan par rapport au contrôle négatif (contenant tous les réactifs à l'exception du "scavenger" potentiel).

8 Mesure de la concentration en H₂O₂

La mesure de la concentration d'H₂O₂ est effectuée à l'aide du kit Amplex Red hydrogen peroxide assay (Invitrogen, Oregon, USA). La peroxydase utilise l'Amplex Red comme donneur d'électrons lors de la réduction de l'H₂O₂ en H₂O. Le produit résultant, la résorufine, est un composé hautement fluorescent (Figure 26). La concentration en H₂O₂ a donc été mesurée par fluorimétrie (Twinkle LB 970, Berthold, Germany)

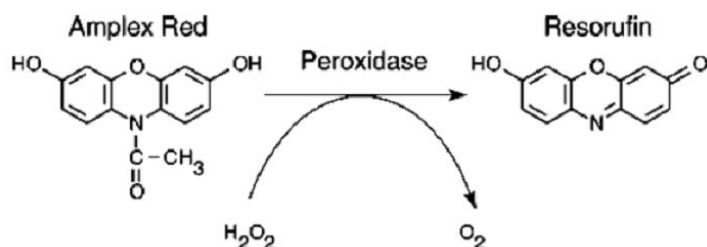


Figure 26 : Principe du dosage de l'H₂O₂ par Amplex Red (résorufine).

Dans une plaque 96 puits, 5 μM d' H_2O_2 sont incubés avec des concentrations croissantes en "scavenger" potentiel pendant 10 min à température ambiante dans 100 μL final. Une condition sans H_2O_2 et sans kynurénine sert de blanc. Pour mesurer la concentration en H_2O_2 restant, 50 μL d'une solution contenant 100 μM d'Amplex Red et 0,4 U/mL d'HRP dilués dans du PBS contenant 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose sont ajoutés par puits. La plaque est immédiatement lue au fluorimètre. L'acide ascorbique, un antioxydant connu, a servi de standard (Balasundram et al., 2005). L'effet "scavenger" est traduit en pourcentage d'inhibition de la fluorescence par rapport au contrôle négatif (contenant tous les réactifs à l'exception du "scavenger" potentiel).

PARTIE V : TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1 Purification de cellules de l'immunité humaines à partir de sang frais

L'Etablissement Français du Sang de Grenoble fournit du sang frais prélevé sur héparine, après consentement éclairé du donneur. Les cellules de l'immunité sont séparées sur gradient de densité Ficoll-Hypaque selon une méthodologie adaptée de celle préalablement décrite en 1968 (Böyum, 1968). Le sang total est dilué au demi dans du tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline solution : KCl 2,7 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; Na_2HPO_4 ($12\text{H}_2\text{O}$) 8,1 mM ; NaCl 137 mM ; pH 7,3) contenant ou non 1 % (v/v) de citrate de sodium trisodique stérile. Cette dilution est déposée délicatement sur un gradient de densité Ficoll-Hypaque ($d = 1,077$) à raison de 3 volume de Ficoll pour 4 volumes de sang dilué. Une centrifugation de 30 min à 400 g à 20°C (accélération et freinage lents) permet de séparer la couche lympho-monocytaire (anneau blanc à l'interface du plasma et de la couche de Ficoll) des polynucléaires et érythrocytes qui sont concentrés dans le culot.

1.1 *Purification des neutrophiles humains*

Après l'étape de centrifugation sur Ficoll décrite précédemment, le culot contenant les polynucléaires neutrophiles et les érythrocytes est remis en suspension dans 50 mL de tampon de lyse isotonique [NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM et EDTA ($2\text{H}_2\text{O}$) 0,1 mM, pH 7,4]. La lyse des érythrocytes s'achève dans la glace en 10 à 15 min. Les neutrophiles sont ensuite récupérés par centrifugation à 460 g pendant 8 min à 4°C, lavés par le tampon de lyse et repris dans du PBS à une concentration finale de 10^8 cellules/mL.

1.2 Purification des monocytes et lymphocytes humains par tri magnétique

Après l'étape de centrifugation sur Ficoll décrite précédemment, l'anneau mono lymphocytaire, ou cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), est récupéré et lavé deux fois en PBS (centrifugation 10 min à 800 *g*, 4°C). La purification des monocytes est réalisée en suivant les instructions du kit CD14 MicroBeads human (Miltenyi Biotech, Paris, France). La méthode est basée sur l'utilisation d'anticorps couplé à des billes magnétiques. L'anneau mono-lymphocytaire marqué par les anticorps anti-CD14 est passé sur une colonne de billes magnétiques fixées à un aimant. La colonne est lavée trois fois pour éliminer les cellules CD14 négatives, puis les cellules CD14 positives sont récupérées en retirant la colonne de l'aimant. Les lymphocytes sont récupérés dans la fraction de lavage de la colonne de purification des monocytes. Les lymphocytes et les monocytes sont repris, séparément, dans du PBS à une concentration finale de 5.10^7 cellules/mL.

1.3 Purification des monocytes par adhésion et différenciation en macrophages

Après l'étape de centrifugation sur Ficoll décrite précédemment, l'anneau mono lymphocytaire est récupéré et lavé deux fois en PBS (une centrifugation 10 min à 600 *g* pour éliminer le Ficoll et une centrifugation de 10 min à 200 *g* pour éliminer les plaquettes). Les PBMC sont ajustées à une concentration de 5.10^6 cellules/mL en milieu de culture AIM V (Invitrogen, Oregon, USA) contenant 2 % (v/v) de sérum AB humain (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) décomplémenté, puis 1 mL est déposé par puits d'une plaque 12 puits. Les cellules sont incubées 2h à 37°C, 5 % CO₂. Les cellules adhérentes sont lavées 3 fois en PBS et les lymphocytes sont éliminés par aspiration-refoulement délicats. Les monocytes ayant adhéré sont ensuite cultivés 7 jours en milieu AIM V, 2 % sérum AB humain décomplémenté, 50 ng/mL GM-CSF (Miltenyi Biotech, Paris, France) pour être différenciés en macrophages (Krausgruber et al., 2011; Rey-Giraud et al., 2012).

1.4 Congélation et décongélation de PBMC

L'anneau mono-lymphocytaire peut également être congelé à 5.10^7 cellules/mL après les deux étapes de lavage en PBS et être utilisées ultérieurement pour purifier les monocytes par adhésion.

Pour la congélation, les cellules sont dénombrées et ajustées à une concentration de 5.10^7 PBMC/mL dans du milieu de culture contenant du DMSO 10 % (v/v) et du SVF 20 % (v/v). Les cellules sont ensuite congelées, à raison de 1 mL par cryotube, pendant au moins 18h à -80°C pour être finalement conservées en azote liquide.

Pour la décongélation, les cryotubes sont immédiatement plongés dans un bain-marie à 37°C. Les cellules décongelées sont rapidement diluées dans un grand volume de milieu de culture AIM V contenant 2 % (v/v) de sérum AB humain décomplémenté et sont ensuite lavées 3 fois en milieu de culture (centrifugation de 8 min à 600 *g* à température ambiante). Les cellules sont dénombrées en présence d'acridine orange et d'iodure de propidium pour estimer la mortalité. Les PBMC sont ajustées à une concentration de 5.10^6 cellules/mL en milieu de culture AIM V contenant 2 % (v/v) de sérum AB humain décomplémenté, puis 1 mL est déposé par puits d'une plaque 12 puits. Le protocole de purification des monocytes par adhésion est le même que celui décrit précédemment.

2 Préparation des stimuli solubles et particuliers opsonisés

2.1 *PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) à 2 µg/mL*

Le PMA induit une stimulation forte et continue des protéines kinases PKC. 2 mg de PMA (Sigma) sont repris dans 1 mL de DMSO, puis dilués au dixième de nouveau en DMSO. Cette solution peut être conservée à -20°C en aliquot. La solution de travail est diluée au centième dans du PBS extemporanément, à une concentration finale de 2 µg/mL et ne peut pas être conservée.

2.2 *Zymosan opsonisé par du sérum AB humain à 16 mg/ml*

16 mg de zymosan (Sigma) sont repris dans 1,6 mL d'eau physiologique et incubés 15 min au bain-marie. Après une centrifugation rapide de 10 sec à 10 000 *g*, le culot de zymosan est repris dans 4 mL de sérum AB et incubé 30 min à 37°C sous agitation. Le zymosan opsonisé est récupéré après une centrifugation de 5 min à 600 *g* à température ambiante, lavé à 3 reprises en PBS et repris dans un volume final de 1 mL de PBS. Le zymosan opsonisé est conservé à -20°C en aliquot.

2.3 *Particules de Staphylococcus aureus marquées à l'Alexa fluor 488 opsonisées au sérum AB humain*

Les particules de *Staphylococcus aureus* marquées à l'Alexa fluor 488 (Invitrogen, Oregon, USA) sont suspendues à une concentration de 2.10^8 cellules/mL et conservées à -20°C. Pour l'opsonisation, un aliquot de 20 µL est repris dans 500 µL de sérum AB humain. Après une incubation à 37°C pendant 1h avec une agitation de 500 rpm à l'abri de la lumière, une centrifugation de 8 min à 20000 *g* est effectuée. Le surnageant est éliminé et les particules

de *Staphylococcus aureus* opsonisées sont reprises dans du PBS contenant 0,9 mM de CaCl₂, 0,5 mM de MgCl₂, 20 mM de glucose et contenant de l'azide.

2.4 *P. aeruginosa* opsonisée au sérum AB humain

Les bactéries sont incubées 5 min à 37°C avec 10 % (v/v) de sérum AB humain en milieu HBSm (modified HEPES-buffered saline solution : Hépès 15 mM à pH 7,4, glucose 8 mM, KCl 4 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ et CaCl₂ 1 mM). Ces préparations de bactéries opsonisées sont utilisées immédiatement.

3 Phagocytose

La phagocytose par les neutrophiles humains de particules de *Staphylococcus aureus* tuées à la chaleur, marquées à l'Alexa fluor 488 (Invitrogen, Oregon, USA) et opsonisées comme décrit précédemment, est analysée par cytométrie en flux. Dans du milieu composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl₂, 0,5 mM de MgCl₂, 20 mM de glucose avec ou sans 5 mM de kynurénine, 5.10⁶ neutrophiles sont stimulés par des particules de *S. aureus*, tuées à la chaleur, marquées à l'Alexa fluor 488, à un facteur d'infection (FI) de 1 ou de 2. Après 30 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée en plaçant les cellules dans la glace. Les neutrophiles sont analysés par cytométrie en flux (Becton Dickinson FACSCanto™ II, Biosciences), avant et après ajout de bleu trypan à 1mg/mL. Le bleu trypan va permettre d'éteindre la fluorescence à l'extérieur des neutrophiles, permettant ainsi de discriminer les particules liées à la membrane, mais non phagocytées, des particules phagocytées (Nuutila and Lilius, 2005). Les données sont collectées sur 10 000 événements de la population de granulocytes et traitées avec le logiciel Flow Jo (Tree Star, ashland, OR USA).

4 Mesure de l'activité NADPH oxydase

4.1 *Chimioluminescence*

La technique de chemiluminescence est particulièrement sensible et permet de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières (Dahlgren and Karlsson, 1999; Lundqvist and Dahlgren, 1996). Cette technique repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé lorsque qu'il retourne d'un état excité vers son état initial. La réaction de chemiluminescence appliquée repose sur une réaction d'oxydation du luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) ou de l'isoluminol (6-Amino-2,3-

dihydro-1,4-phthalazinedione) dépendante de la peroxydase HRPO (horseradish peroxidase) et de la peroxydase intrinsèque MPO. Le retour du luminol ou de l'isoluminol excité vers son état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière quantifiée par un luminomètre (Mithras LB 940, Berthold Technologies). L'émission de lumière est directement proportionnelle à l'activité NADPH oxydase des cellules (**Figure 27**).

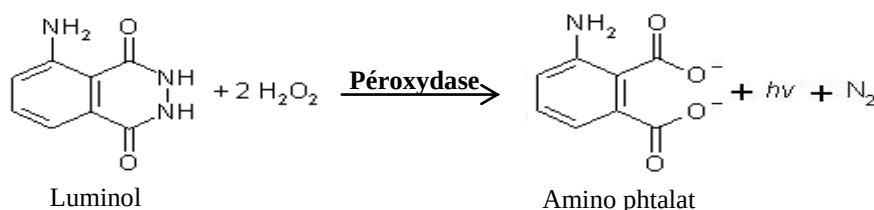


Figure 27 : Réaction d'oxydation du luminol par l' H_2O_2 .

Le luminol est une molécule ayant la capacité de passer la membrane cellulaire et qui va donc pouvoir détecter la production d' H_2O_2 intra et extracellulaire. L'isoluminol a la même réactivité que le luminol mais il ne peut pas traverser les membranes (**Figure 28**) et sera donc utiliser pour déterminer la production extracellulaire d' H_2O_2 uniquement. Afin d'accéder à la production d' H_2O_2 intracellulaire uniquement, le luminol sera utilisé avec en complément deux "scavengers" de FRO agissant en extracellulaire : la catalase et la superoxyde dismutase (SOD).

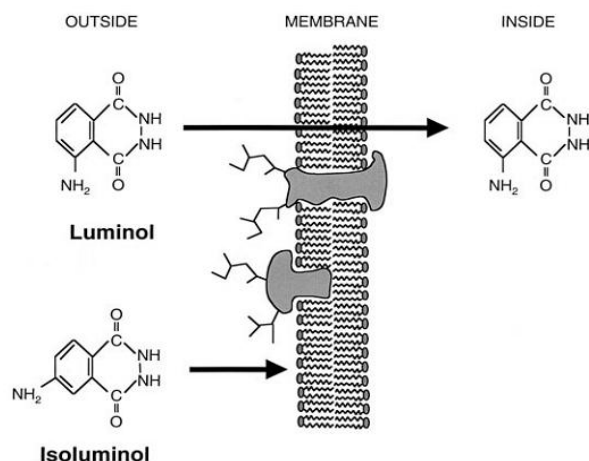


Figure 28 : Structure moléculaire et perméabilité membranaire du luminol et de l'isoluminol (Dahlgren and Karlsson, 1999).

La mesure s'effectue en plaque 96 puits à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par puits, resuspendues dans 50 μl de PBS. Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose, 20 μM de luminol ou d'isoluminol et 10 U/mL de

HRPO et de 2000 U/mL de catalase et 50 U/mL de SOD ou non (Li et al., 2005; Lundqvist and Dahlgren, 1996). Les cellules sont incubées dans le luminomètre 5 min à 37°C avec 200 µL de milieu réactionnel puis l'activité oxydase est stimulée par l'ajout de divers agonistes : du PMA 80 ng/mL, du zymosan opsonisé 0,64 mg/mL ou du *P. aeruginosa* opsonisé à un FI de 2. L'émission relative de lumière est enregistrée à 37°C pendant 30 min avec une mesure toutes les 15 sec pour le PMA, et pendant 1h avec une mesure toutes les minutes pour les agonistes opsonisés. Les résultats sont exprimés en somme des URL émis.

4.2 Réduction du cytochrome c

Ici l'activité NADPH oxydase est déterminée par mesure de la cinétique de réduction du cytochrome c par les anions superoxydes : $\text{Cyt. c}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Cyt. c}^{2+} + \text{O}_2$. L'augmentation de l'absorbance est suivie à 550 nm (coefficient d'extinction molaire : $\epsilon_{550} = 21,1 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Menegazzi et al., 1994; Stasia et al., 2003).

Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose et 130 µM de cytochrome c. Les neutrophiles à raison de 5.10^6 cellules/mL sont incubés 5 min à 37°C dans le milieu réactionnel puis l'activité oxydase est stimulée par l'ajout de PMA 80 ng/mL. La cinétique d'activation est suivie pendant 20 min et l'activité oxydase des neutrophiles est mesurée en prenant en compte les 10 premières minutes du burst oxydatif. Compte tenu qu'une mole de cytochrome c est réduit par 1 mole d' O_2^- , l'activité oxydase est exprimée en $\text{nmol O}_2^-/\text{min}/10^7$ neutrophiles.

4.3 Oxygraphie

Dans cette expérience, l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles humains est mesurée par la disparition du substrat (l'oxygène). Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées à 37°C. La décroissance de la concentration en oxygène soluble dans la chambre est mesurée via une électrode de Clark sensible à l'oxygène (Verhoeven et al., 1999), reliée à un moniteur analysant la consommation d'oxygène (YSI Model 5300 Biological Oxygen Monitor, YSI incorporated, Ohio, USA) et à un enregistreur (Servotrace, Sefram, Paris).

Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , 20 mM de glucose et 1 mM d'azide (afin d'inhiber la respiration mitochondriale des cellules). Les neutrophiles sont ajoutés à une concentration finale de 5.10^6 cellules/mL et incubés jusqu'à équilibration de l'électrode, correspondant à la quantité d' O_2 dans le milieu. L'activité oxydase est stimulée par l'ajout de PMA 2 µg/mL ou de zymosan opsonisé 5

mg/mL et est suivie pendant 5 min. En prenant en compte qu'une saturation de 100 % équivaut à 200 nmoles d'O₂/mL, l'activité oxydase est exprimée en nmol O₂ consommées / min / 10⁷ neutrophiles.

5 **Bactéricidie**

Les mutants de *P. aeruginosa* sont mis en culture à 37°C sous agitation en milieu LB. Après 6h de culture, soit une DO₆₀₀ d'environ 3,5 qui représente le début de la phase stationnaire, les bactéries sont ajustées à une DO₆₀₀ de 1 pour être ensuite opsonisées. La bactéricidie est réalisée en triplicat en plaque 96 puits en milieu HBSm contenant 5.10⁵ neutrophiles humains et 5.10⁵ bactéries opsonisées (soit un FI de 1) dans un volume final de 200 µL. La plaque est incubée à 37°C sans agitation, et des prélèvements sont réalisés au temps 0 et après 30 min, 1 h et 2 h d'interaction. Des dilutions en série sont effectuées et étalées en duplicat sur milieu PIA. Les UFC sont dénombrées après une nuit d'incubation à 37°C. Le pourcentage de bactéries viables est calculé par rapport au nombre d'UFC au temps 0 d'incubation (Carrichon et al., 2011; Dacheux et al., 1999).

6 **Activation des macrophages**

Après 7 jours de différenciation des monocytes en macrophages, les cellules sont lavées trois fois en PBS. Les macrophages sont activés par ajout des bactéries opsonisées CHA *ΔpopBD* produisant différents niveaux de kynurénine. Après 1h de contact, les bactéries sont tuées par l'ajout de 200 µg/mL de gentamicine. Les macrophages sont ensuite incubés à 37°C en "candle jar".

Afin de mimer le contact avec les bactéries, les macrophages sont activés par du LPS de *P. aeruginosa* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) à 1 µg/mL, en présence ou en l'absence de 100 µM de kynurénine synthétique. Les macrophages sont ensuite incubés à 37°C en "candle jar".

7 **Analyse de l'activation des macrophages par cytométrie en flux**

7.1 ***Principe de la cytométrie en flux***

La technique de cytométrie en flux ou FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) permet le dénombrement et l'analyse multiparamétrée une à une de particules en suspension dans un

milieu liquide, en général des cellules. L'analyse se fait individuellement pour chaque cellule et les résultats obtenus fournissent la répartition cellulaire en fonction du ou des paramètres étudiés. Les paramètres mesurés peuvent être la fluorescence produite par des anticorps conjugués à un fluorophore ou celle directement produite par des composés fluorescents, ainsi que la taille et la granulométrie de cellules. La fluorescence émise est mesurée dans un cytomètre grâce à des détecteurs photomultiplicateurs spécifiques d'une gamme de longueur d'onde : canaux FL1 à FL4 (FACScalibur, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les données sont collectées sur 10 000 événements (sauf pour les PBMC, 50 000 événements) d'une population en fonction de sa taille et de sa granulométrie et traitées avec le logiciel Flow Jo.

7.2 Anticorps utilisés pour l'étude

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux et leurs conditions d'utilisation.

Anticorps			Fournisseur	Dilution
CD197 (CCR7)	Rec human	FITC	Miltenyi Biotech	1/10
CD209 (Mannose R)	IgG1	APC	Miltenyi Biotech	1/10
HLA-DR	IgG2a	VioBlue	Miltenyi Biotech	1/10
AhR	IgG2b	PE	eBioscience	1/20

7.3 Protocole de marquage extracellulaire

Après les 7 jours de différenciation des monocytes en macrophages, ou après 48h d'activation des macrophages, les cellules en suspension sont récupérées et les cellules adhérentes sont décollées par une incubation de 30 min à 37°C avec 300 µL par puits de StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) puis décollées délicatement à l'aide d'un râteau. Les macrophages sont lavés en PBS puis resuspendus dans 100 µL de milieu de marquage (PBS contenant 0,5 % de BSA et 2 mM d'EDTA) contenant les anticorps dilués comme indiqué dans le **Tableau 5**. Après 30 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées trois fois en milieu de marquage puis analysées rapidement par FACS.

7.4 Protocole de marquage intracellulaire

Ce marquage est réalisé sur les neutrophiles humains, les PBMC et les macrophages avant activation ou après 48h d'activation. Les cellules sont fixées par 2 % de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 min à température ambiante. Après 3 lavages en milieu

de marquage intracellulaire (PBS contenant 0,5 % de BSA, 2 mM d'EDTA et 0,01 % de saponine) les cellules sont reprises dans 100 μ L de milieu contenant l'anticorps anti-récepteur d'aryl hydrocarbon (AhR) dilués comme indiqué dans le **Tableau 5**. Après 30 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées trois fois en milieu de marquage puis analysées rapidement par FACS.

8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graph Pad Prism 5. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (ESM). Les moyennes ont été comparées en utilisant un test ANOVA suivi d'un test Turkey ou Bonferroni selon le cas, $p < 0,05$ étant considéré comme significatif.

RESULTATS

PARTIE I : INTERACTION HÔTE/PATHOGENE ENTRE *P. AERUGINOSA* ET LES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE

1 Métabolisme *in vitro* de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*

1.1 La voie des kynurénines est fonctionnelle dans les souches cliniques

Afin de souligner l'intérêt de la voie des kynurénines dans les bactéries *P. aeruginosa*, des souches cliniques issues de patients atteints de mucoviscidose ont été collectées pour évaluer leur production de kynurénine (**Figure 29**).

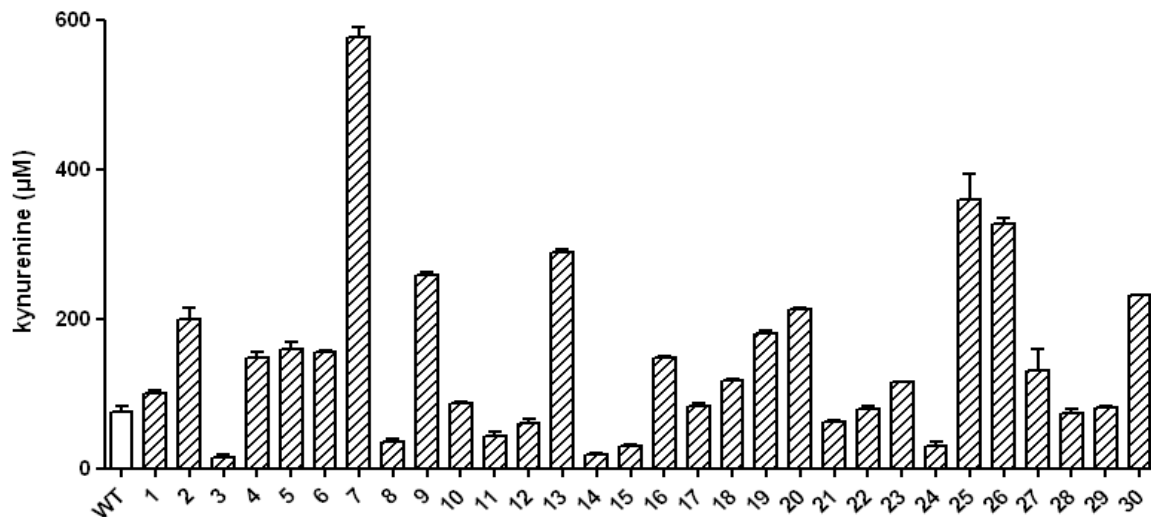


Figure 29 : Mesure de la production de kynurénine par les souches cliniques de *P. aeruginosa*.

Les souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose ont été mises en culture dans 2mL de LB à une DO_{600} initiale de 0,2 et cultivées sous agitation à 250 rpm à 37°C. Après 8h de culture, un prélèvement a été effectué et la production de kynurénine dans le surnageant a été évaluée grâce au réactif de Kovac. Du milieu LB a servi de blanc (n=3).

La souche produisant le moins de kynurénine est la souche 3, qui est définie comme la souche "non productrice". Seulement quatre souches parmi les trente testées, les souches 3, 14, 15 et 24, peuvent également être considérées comme "non productrices". La plupart des souches cliniques (26/30) produisent de la kynurénine en quantité variable, mettant en avant que la voie des kynurénines est probablement importante dans l'activité de *P. aeruginosa* (**Figure 29**). De plus, les deux tiers des souches testées produisent davantage de kynurénine que notre souche de référence CHA (WT), qui est également un isolat clinique (Toussaint et al., 1993). Ces résultats montrent que la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est fonctionnelle dans les souches cliniques de patients atteints de mucoviscidose, avec des niveaux variés de production.

1.2 La voie des kynurénines est active en fin de phase exponentielle

Nous avons déterminé dans quelle phase de croissance la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est la plus active. Cela peut nous aider à comprendre dans quelle phase de l'infection cette voie est impliquée : en phase d'infection aiguë, lors du développement actif des bactéries, ou en phase d'infection chronique, lors de la phase stationnaire de croissance. La souche bactérienne *pkynA::lux* (portant sur son chromosome une fusion transcriptionnelle avec l'opéron de la luciférase couplé au promoteur *kynA*, le premier gène de la voie des kynurénines) a été mise en culture en LB et un prélèvement a été réalisé toutes les heures. A chaque temps, l'activité transcriptionnelle du promoteur *kynA* a été évaluée, grâce aux photons produits par les bactéries lors de l'activation du promoteur *kynA*, ainsi que la croissance des bactéries (**Figure 30A**). De plus la production de kynurénine dans le surnageant a été mesurée par test colorimétrique grâce au réactif de Kovac (**Figure 30B et C**).

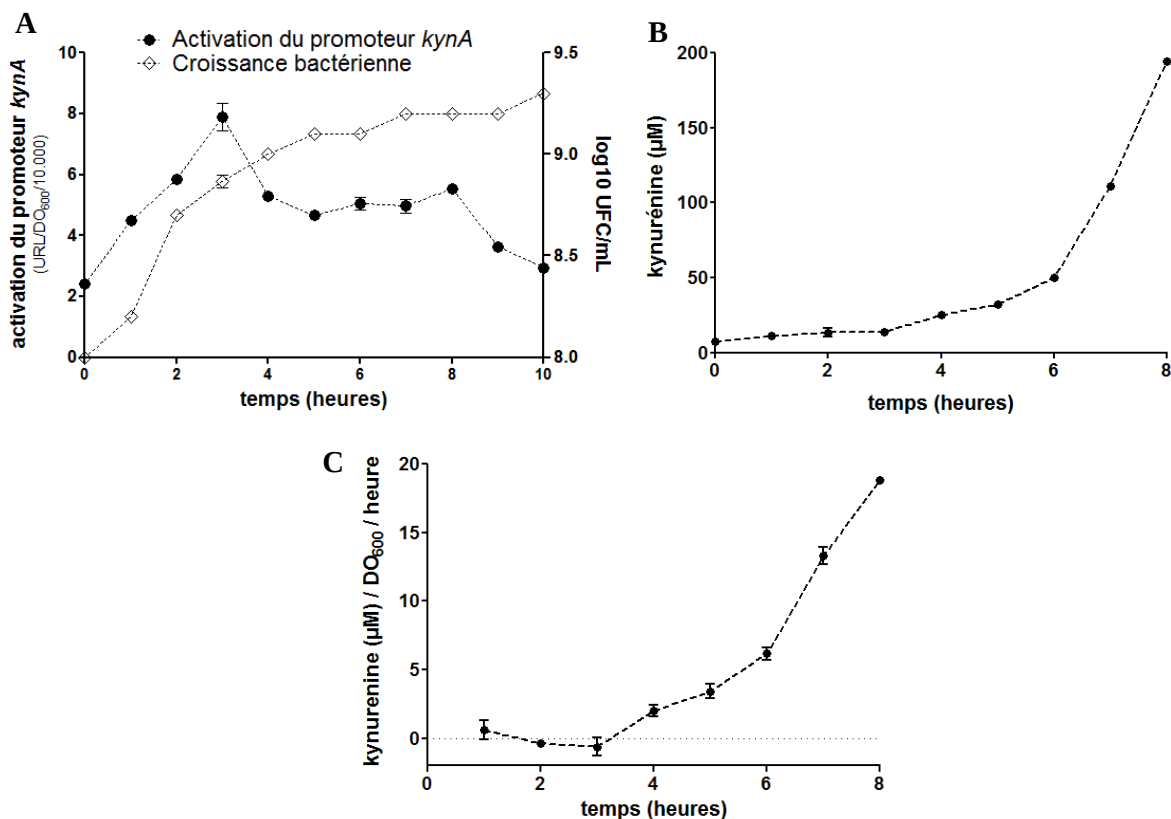


Figure 30 : Cinétique de l'activation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* lors de la croissance en milieu LB.

Les bactéries *pkynA::lux* ont été mises en culture dans 3mL de LB à une DO₆₀₀ initiale de 0,2 et cultivées sous agitation à 250 rpm à 37°C. Toutes les heures un prélèvement a été effectué. (A) La DO₆₀₀ a été mesurée ainsi que la luminescence émise par la culture, n=3. (B et C) La production de kynurénine dans le surnageant a été évaluée grâce au réactif de Kovac, n=3.

L'étude de l'activité transcriptionnelle du gène *kynA* montre qu'il y a un pic d'activation après 3h de culture, en fin de phase exponentielle (**Figure 30A**). De plus, après 5 à 6h de culture, il y a une forte augmentation de la concentration en kynurénine dans le surnageant (**Figure 30B**). Il semblerait donc qu'il y ait accumulation de kynurénine dans le surnageant, principalement dès le début de la phase stationnaire. La production de kynurénine en fonction de la quantité de bactéries par heure augmente fortement à partir de 3h, c'est-à-dire au moment du pic de transcription de *kynA* (**Figure 30C**). Ces résultats suggèrent, qu'en plus d'être impliquée dans la phase aiguë de l'infection, comme cela a été montré chez la souris (Chaker, 2012), la kynurénine pourrait également avoir un rôle lors de la transition de la phase aiguë à la phase chronique de l'infection.

1.3 La kynurénine n'est pas sécrétée dans le surnageant via les pompes à efflux

Comme cela a été montré précédemment, les bactéries sécrètent la kynurénine dans le surnageant. Notre hypothèse est que la kynurénine sécrétée dans le milieu par les bactéries pourrait avoir un effet sur l'immunité de l'hôte. Il serait donc intéressant de connaître les mécanismes de transport de cette molécule dans le milieu extracellulaire. En effet, il a été suggéré que la kynurénine est transportée par le système de pompe à efflux (Olivares et al., 2012). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le Phe-Arg β -naphthylamide dihydrochloride (PA β ND), qui est un inhibiteur connu des pompes à efflux chez *P. aeruginosa* (Papadopoulos et al., 2008). Les bactéries ont été mises en culture avec des doses croissantes en PA β ND dans le milieu et la production de kynurénine dans le surnageant a été mesurée toutes les 2h (**Figure 31**).

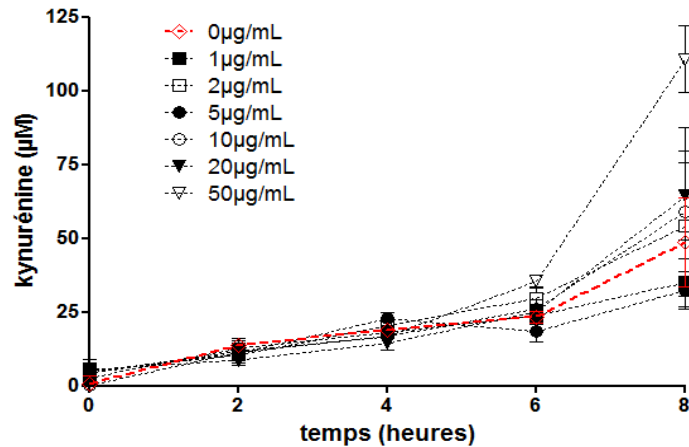


Figure 31 : Effet du PAβND sur la sécrétion de kynurénine dans le surnageant.

La souche CHA de *P. aeruginosa* a été mise en culture dans 2mL de LB à une DO_{600} initiale de 0,2 et cultivée sous agitation à 250 rpm à 37°C avec des doses croissantes de l'inhibiteur des pompes à efflux (le PAβND) dans le milieu. Toutes les deux heures, la production de kynurénine dans le surnageant a été évaluée grâce au réactif de Kovac. Du milieu LB avec les doses croissantes en PAβND a servi de blanc pour chacune des conditions correspondantes (n=3).

Aucune diminution significative de la concentration en kynurénine dans le milieu n'a été observée. Au contraire, à la dose maximale en PAβND (50µg/mL), il y a une augmentation de cette concentration. Cela est probablement dû au fait qu'à forte dose cette inhibiteur des pompes à efflux perméabilise les membranes bactériennes (Iino et al., 2012). La kynurénine n'est donc pas directement sécrétée par les pompes à efflux.

2 Interaction hôte/pathogène entre *P. aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée

2.1 *La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est activée lors du contact avec les cellules de l'immunité innée*

Nous avons évalué l'activation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* lors du contact avec différentes cellules de l'immunité, dans le but de mieux comprendre le rôle de cette voie de signalisation lors de l'interaction avec l'hôte. Pour cela, des expériences d'interaction hôte-pathogène ont été réalisées en mettant en contact les bactéries avec les trois types majeurs de cellules de l'immunité : les neutrophiles (immunité innée), les lymphocytes (immunité adaptative) et les monocytes (cellules pouvant faire le lien entre immunité innée et adaptative). Ces cellules ont été purifiées à partir de sang humain total et mises en contact avec la souche rapportrice *pkynA::lux* de *P. aeruginosa* (Figure 32).

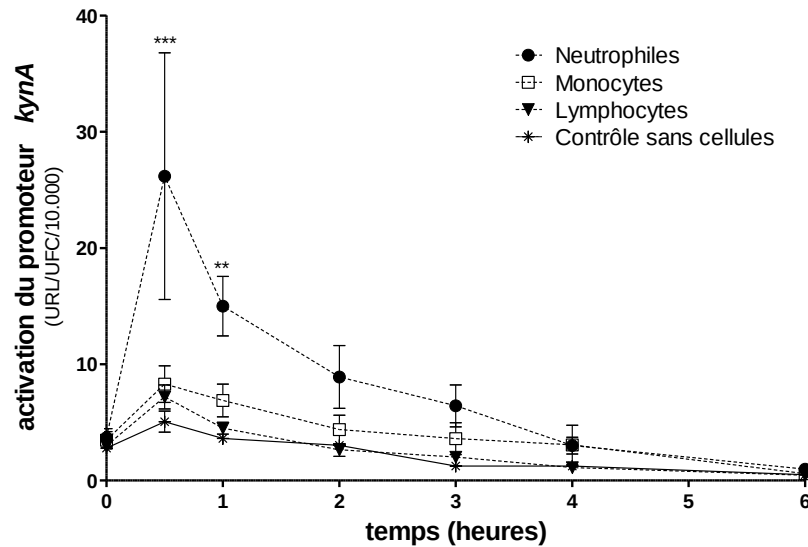


Figure 32 : Activation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* lors du contact avec les cellules de l'immunité.

Les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes ont été purifiés à partir de sang humain total comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Ces cellules ont été incubées avec la souche de *P. aeruginosa* *pkynA::lux* à un facteur d'infection (FI) de 1. La condition contrôle a été réalisée avec les bactéries opsonisées seules. Aux temps indiqués, la luminescence émise par les bactéries et les UFC (unités formant colonie) ont été mesurées. Les résultats avec une p value de $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) sont indiqués (n=4).

Nous avons obtenu une activation significative de la voie des kynurénines uniquement lors du contact de *P. aeruginosa* avec les neutrophiles humains. Cette interaction a entraîné une augmentation significative de la transcription de *kynA*, à 30 min ($p < 0,001$) et à 1 h ($p < 0,01$) de contact, avec un pic de luminescence par bactérie à 30 min (**Figure 32**). Lors du contact avec les monocytes et les lymphocytes, bien qu'il y ait un pic d'activation à 30 min, celui-ci n'est pas considéré comme significatif comparé à la condition contrôle, les bactéries opsonisées seules. La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est donc activée au contact avec les cellules de l'immunité, et en particulier avec les neutrophiles.

N'ayant pas obtenu d'activation significative de la voie des kynurénines lors du contact de *P. aeruginosa* avec les monocytes, nous nous sommes intéressés à l'interaction avec les macrophages issus de monocytes humains. Pour cela, des monocytes issus de sang humain ont été mis en culture pendant 7 jours, en présence de GM-CSF, pour être différenciés en macrophages. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'obtention de macrophages par une analyse microscopique après coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG, **Figure 33A**). Ces cellules ont ensuite été mises en contact avec la souche *pkynA::lux* de *P. aeruginosa* pour

étudier l'activation de la voie des kynurénines de la bactérie lors du contact avec les macrophages (**Figure 33B**).

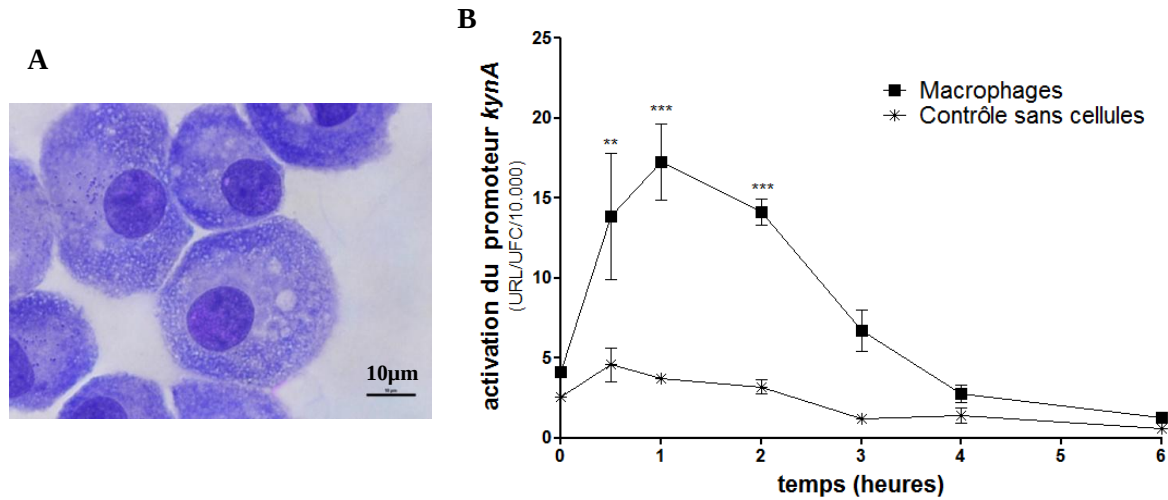


Figure 33 : Activation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* lors du contact avec des macrophages issus de monocytes humains.

Les monocytes humains adhérents ont été cultivés 7 jours en milieu AIM V contenant 2% de sérum humain et 50ng/mL de GM-CSF pour être différenciés en macrophages. (A) Une coloration MGG a été effectuée sur les cellules obtenues puis ces dernières ont été analysées par microscopie à un grossissement X100. (B) Les macrophages issus de monocytes humains ont été incubés avec la souche de *P. aeruginosa* *pkynA::lux* à un FI de 1. La condition contrôle a été réalisée avec les bactéries opsonisées seules. Aux temps indiqués, la luminescence émise par les bactéries et les UFC ont été mesurées. Les résultats avec une p value de $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) sont indiqués ($n=3$).

Les cellules obtenues ont la morphologie attendue, avec un diamètre d'environ 30 µm, un noyau rond et de nombreuses vacuoles, caractéristiques des macrophages (**Figure 33A**). Lors du contact des macrophages issus de monocytes humains avec *P. aeruginosa*, une activation significative de la transcription de *kynA* a été observée, à 30 min ($p < 0,01$), 1 h ($p < 0,001$) et 2 h ($p < 0,001$) de contact avec les bactéries, avec un pic de luminescence par bactérie à 1 h (**Figure 33B**). La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est donc activée lors du contact avec les macrophages.

2.2 Construction de mutants de la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*

Afin de pouvoir évaluer l'effet de la kynurénine produite par *P. aeruginosa* sur la réponse immunitaire de l'hôte, des souches bactériennes produisant différents niveaux de kynurénine ont été générées par échange allélique. Ces mutations ont été réalisées sur deux

souches bactériennes du laboratoire : la souche WT et la souche *ΔpopBD* (**Figure 34**). Cette dernière a été délétée de l'opéron codant pour les protéines de translocation permettant au système de sécrétion de type III (SST3) de traverser la membrane des cellules hôtes afin d'injecter les toxines directement à l'intérieur de la cellule. Ceci permet de diminuer fortement la cytotoxicité des bactéries lors des expériences d'interaction hôte-pathogène, permettant de travailler à des facteurs d'infection plus élevés.

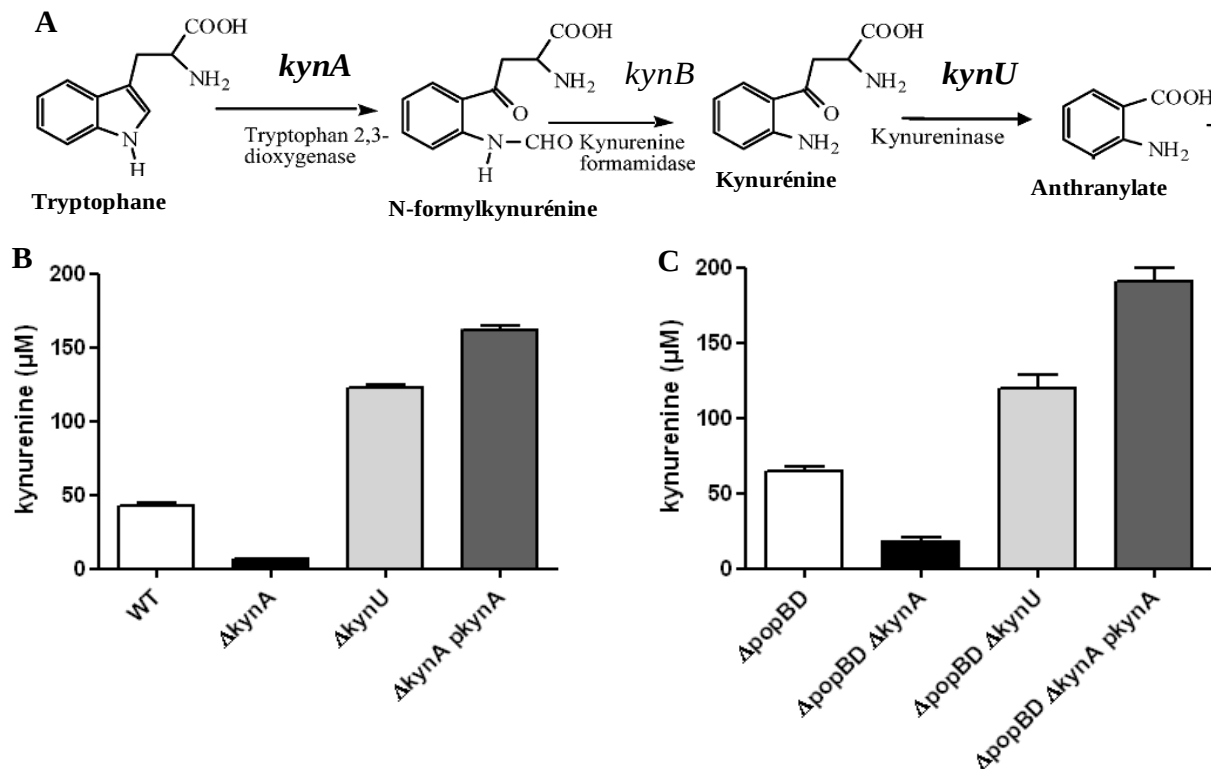


Figure 34 : Génération de souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine

(A) Voie des kynurénines de *P. aeruginosa*. (B, C). Les souches WT et *ΔpopBD* ont été délétées des gènes *kynA* ou *kynU* et les souches *ΔkynA* a été complémentées par le plasmide pUCP20-*kynA* comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Les différentes souches de *P. aeruginosa* ont été mises en culture dans 2mL de LB à une DO_{600} initiale de 0,2 et cultivées sous agitation à 250 rpm à 37°C. Après 6 h de culture, un prélèvement a été effectué et la production de kynurénine dans le surnageant a été évaluée grâce au réactif de Kovac. Du milieu LB a servi de blanc (n=3).

Quatre souches produisant différents niveaux de kynurénines ont été obtenues pour les souches WT et *ΔpopBD* (**Figure 34B et C**, respectivement). Les souches *ΔkynA* ont été délétées du premier gène de la voie des kynurénines et donc n'en produisent pas. Les souches *ΔkynU* ont été délétées du gène responsable de la conversion de la kynurénine en anthranylate et donc permet l'accumulation de la kynurénine. Les souches *ΔkynA pkynA* sont les souches complémentées avec le plasmide multi-copie pUCP20 *kynA* inductible à l'IPTG et

"surproduisent" la kynurénine. Les souches *ΔkynA* et *ΔkynU* ont une voie du PQS inhibée, car il n'y a pas de production d'anthranilate via la voie des kynurénines. Au contraire, les souches WT, *ΔpopBD* et leurs mutants *ΔkynA pkynA* ont une voie du PQS active. L'ensemble de ces quatre souches permettra d'évaluer l'impact de la kynurénine bactérienne sur les cellules du système immunitaire.

2.3 La kynurénine favorise la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles

Nous avons étudié plus précisément l'interaction entre les neutrophiles humains et *P. aeruginosa* pour comprendre le rôle de la voie des kynurénines lors de cette interaction hôte-pathogène. Pour cela, l'activité bactéricide des neutrophiles lors du contact avec *P. aeruginosa* a été analysée ainsi que certains mécanismes de bactéricidie, comme la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) et la phagocytose. Dans un premier temps, l'impact de la kynurénine sur la survie de *P. aeruginosa* lors du contact avec les neutrophiles a été étudié. Ces expériences ont été réalisées soit en utilisant des souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine, soit en ajoutant de la kynurénine synthétique dans le milieu lors de l'interaction (**Figure 35**).

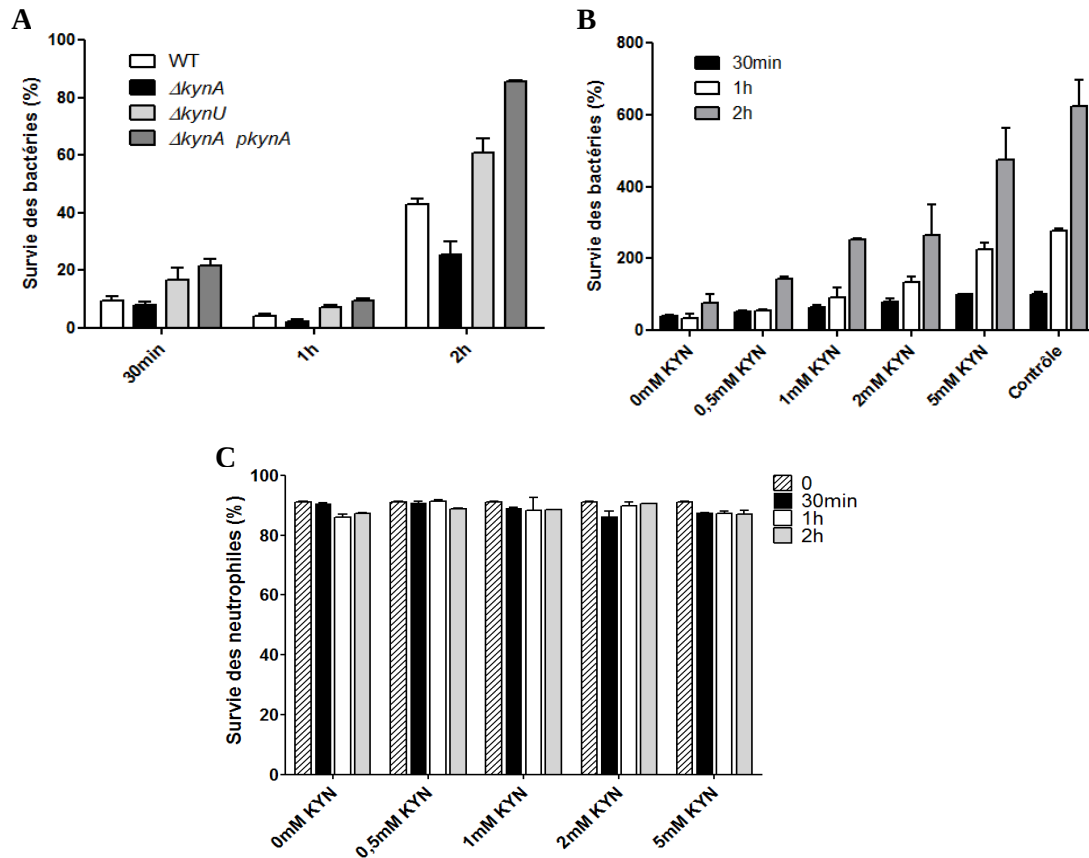


Figure 35 : Impact de la kynurénine sur la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles humains.

Les neutrophiles ont été incubés avec les souches opsonisées de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine à un FI de 1 (A), ou avec la souche WT opsonisée à un FI de 1 avec des concentrations croissantes en kynurénine dans le milieu (B). Aux temps indiqués, la survie des bactéries a été mesurée. Le pourcentage de survie a été calculé en fonction du nombre d'UFC au temps 0. La condition contrôle a été réalisée avec les bactéries opsonisées seules. Ces expériences sont représentatives de quatre (A) et trois expériences réalisées (B). (C) La mesure de la toxicité de la kynurénine synthétique sur les neutrophiles a été réalisée par test d'exclusion au bleu trypan (n=3).

Nous remarquons que la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles est proportionnelle à la quantité de kynurénine produite par les différentes souches (**Figure 35A**). En effet, les souches $\Delta kynU$ et $\Delta kynA pkynA$, qui accumulent et surproduisent la kynurénine respectivement, sont plus résistantes à l'activité bactéricide des neutrophiles humains (60 et 80% de survie à 2 h d'incubation respectivement), comparé à la souche WT et à la souche $\Delta kynA$ qui ne produit pas de kynurénine (45 et 25% de survie à 2 h d'incubation respectivement).

Pour confirmer ces résultats, des quantités croissantes en kynurénine ont été ajoutées dans le milieu, lors du contact entre la souche WT et les neutrophiles humains, afin de mimer le relargage de kynurénine par les bactéries. Un effet similaire a été obtenu (**Figure 35B**). En

l'absence de kynurénine, la survie des bactéries est comprise entre 30 et 40% à 30 min et 1 h de contact. Par la suite, la survie des bactéries est directement proportionnelle à la quantité de kynurénine présente dans le milieu. Avec la dose maximale de 5 mM, il n'y a pas de mortalité à 30 min et il y a un doublement de la population à 1 h et 2 h. Ces résultats démontrent clairement que la kynurénine favorise la survie des bactéries lors du contact avec les neutrophiles humains. De plus, la non-toxicité de la kynurénine envers les neutrophiles humains a également été évaluée. Même après 2 h d'incubation, aucun effet sur la viabilité des neutrophiles n'a été observé (**Figure 35C**). Ces résultats suggèrent donc que la voie des kynurénines permet à *P. aeruginosa* d'échapper à l'activité bactéricide des neutrophiles humains sans affecter la viabilité de ces cellules.

2.4 La kynurénine inhibe la production de FRO

Le mécanisme moléculaire majeur de microbicidie des neutrophiles est la production de FRO par le complexe enzymatique de la NADPH oxydase. Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la survie des bactéries via la kynurénine, la production de FRO par les neutrophiles humains a été mesurée par chimioluminescence pendant 90 min, en présence de souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine (**Figure 36A**). La production totale de FRO a été exprimée en somme des unités relatives de luminescence (URL) mesurée durant 60 min d'activation (**Figure 36B**). Egalement, pour confirmer l'effet de la kynurénine sur la production de FRO, des doses croissantes en kynurénine ont été ajoutées dans le milieu. Les neutrophiles ont été activés avec du zymosan opsonisé (activateur particulaire phagocyté par les neutrophiles, **Figure 36C**) ou du PMA (un activateur soluble qui n'a pas besoin d'être phagocyté pour stimuler les neutrophiles, **Figure 36D**) et la production de FRO a été suivie par chimioluminescence pendant 1 h et 30 min, respectivement.

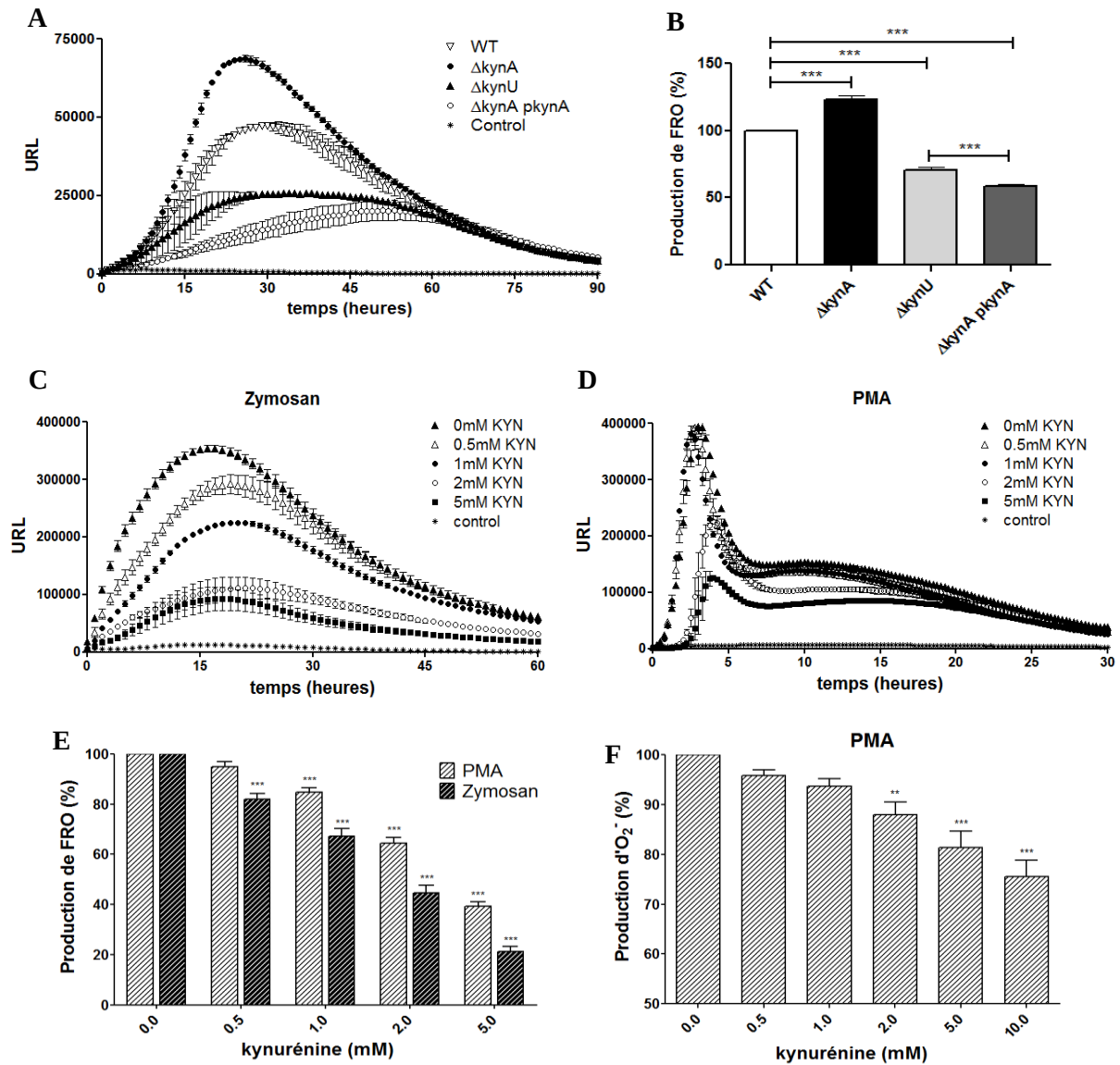


Figure 36 : Impact de la kynurénine sur la production de FRO.

(A) Les neutrophiles humains ont été stimulés par des souches opsonisées de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine à un FI de 2 et les FRO produites ont été mesurées par chimioluminescence. (B) La production totale de FRO par les neutrophiles après stimulation avec les différentes souches de *P. aeruginosa* est exprimée en somme des URL accumulées en 60 min. Les neutrophiles humains ont également été stimulés avec du zymosan opsonisé 0,64 mg/mL (C) ou du PMA 80 ng/mL (D) en présence de quantités croissantes en kynurénine dans le milieu. (E) La production de FRO a été exprimée par la somme des URL accumulées en 30 min ou 15 min après stimulation par le zymosan ou le PMA, respectivement. (F) La production d'O₂⁻ a été mesurée par réduction du cytochrome c après stimulation par le PMA 80 ng/mL. Les cinétiques sont représentatives de 6 expériences réalisées. Les conditions sans kynurénine ou après activation par la souche WT sont utilisées comme 100%. Les résultats avec une p value de $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) sont indiqués (n=6).

Lorsqu'une souche bactérienne ne produit pas de kynurénine (souche Δ kynA), il y a une augmentation de la production de FRO par les neutrophiles (125% de production de FRO, $p < 0,001$), comparé à la production de FRO lors du contact avec la souche WT. Au contraire,

lors du contact avec les souches qui accumulent ou surproduisent la kynurénine (souches *ΔkynU* et *ΔkynA pkynA*), il y a 30 et 40% d'inhibition de la production de FRO respectivement ($p < 0,001$). Nous pouvons donc conclure que la kynurénine bactérienne inhibe la production de FRO par les neutrophiles humains.

De plus, comme attendu, les quantités croissantes en kynurénine ont conduit à une diminution proportionnelle de la production de FRO. Ces résultats sont significatifs même à faible dose (0,5 mM) après stimulation par du zymosan opsonisé et à partir de 1 mM après stimulation par du PMA. En présence de la dose maximale en kynurénine (5 mM), il y a 80 et 60% d'inhibition de la production de FRO après activation des neutrophiles par du zymosan opsonisé et du PMA, respectivement (**Figure 36E**). Ces résultats démontrent que la kynurénine permet l'inhibition de la production de FRO, quel que soit le stimulus utilisé. La production d' O_2^- par les neutrophiles après stimulation au PMA a également été testée, par dosage de la réduction du cytochrome *c*. A nouveau, un effet inhibiteur de la kynurénine a été observé, mais avec une efficacité moindre, 2 mM étant nécessaire pour obtenir une inhibition significative (**Figure 36F**).

2.5 La kynurénine est un scavenger des FRO

Pour mieux comprendre le mode d'action de la kynurénine dans l'inhibition de la production de FRO, plusieurs mécanismes ont été explorés (**Figure 37**). Lors du contact entre *P. aeruginosa* et les neutrophiles, les bactéries sont phagocytées. Par la suite, le complexe enzymatique de la NADPH s'assemble et consomme de l'oxygène pour produire des FRO. Les FRO, telles que l' O_2^- et l' H_2O_2 participent à l'activité bactéricide des neutrophiles.

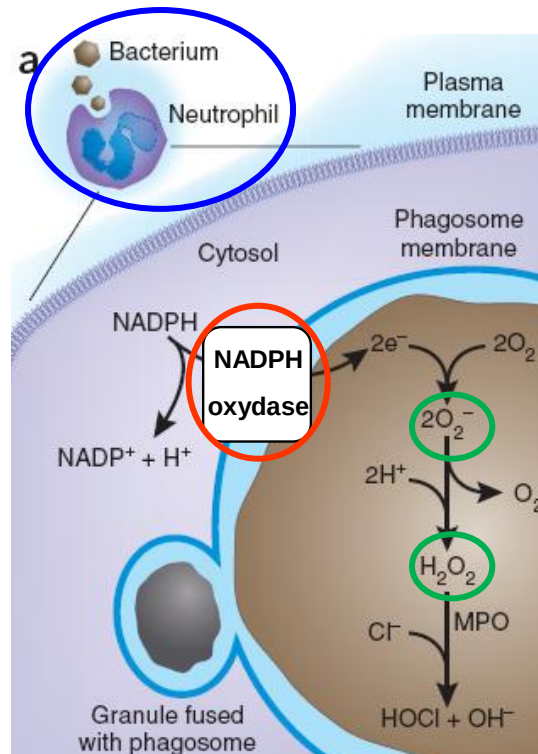


Figure 37 : Génération de FRO par les neutrophiles suite à la phagocytose des bactéries (Winterbourn, 2008)

Entouré en bleu : phagocytose des bactéries par les neutrophiles. Entouré en rouge : assemblage du complexe NADPH oxydase et consommation d'oxygène pour la production de FRO. Entouré en vert : FRO produites pour l'activité bactéricide des neutrophiles.

Nous avons donc évalué l'effet de cette molécule sur la phagocytose, la consommation d'oxygène par la NADPH oxydase et le "scavenging" de l'O₂⁻ et de l'H₂O₂.

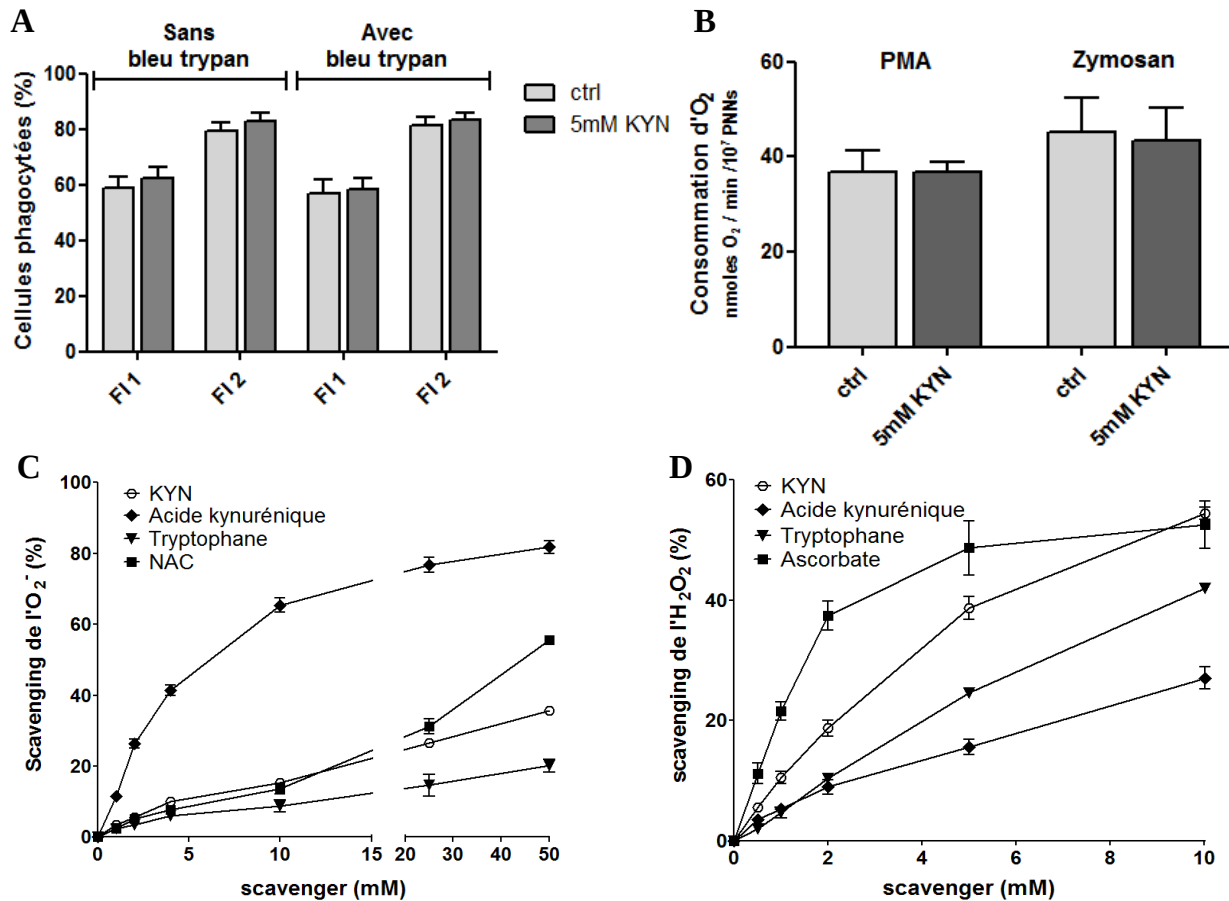


Figure 38 : Mode d'action de la kynurénine pour l'inhibition de la détection des FRO.

(A) Les neutrophiles humains ont été stimulés avec des particules fluorescentes de *S. aureus* (Alexa Fluor 488) à un FI de 1 ou 2, en présence ou en l'absence de 5 mM de kynurénine pendant 30 min et ont ensuite été traités ou non par du bleu trypan à 1 mg/mL. L'activité phagocytaire a été analysée par cytométrie en flux. (B) Les neutrophiles humains ont été stimulés par du PMA 2 µg/mL ou du zymosan opsonisé 5 mg/mL, en présence ou en l'absence de 5 mM de kynurénine. La consommation d'oxygène par la NADPH oxydase a été mesurée par oxygraphie. (C) Les anions superoxydes ont été produits en système non-enzymatique PMS-NADH en présence de concentrations croissantes en kynurénine (KYN), acide kynurénique, tryptophane ou N-acétyl-cystéine (NAC). L'effet "scavenger" a été évalué par réduction du NBT. (D) 5 µM d'H₂O₂ ont été incubés en présence de concentrations croissantes en kynurénine (KYN), acide kynurénique, tryptophane ou acide ascorbique 10 min à température ambiante. L'H₂O₂ restant a été détecté par l'Amplex® Red (résorufine), une méthode fluorimétrique (n= 4-6).

La phagocytose de particules fluorescentes de *Staphylococcus aureus* par les neutrophiles a été analysée par FACS, en présence ou en l'absence de 5 mM de kynurénine, avec ou sans bleu trypan. Il n'y a pas de différence significative dans l'activité phagocytaire des neutrophiles, que ce soit en présence en ou absence de bleu trypan. Ceci signifie que la quantité de particules liées à la membrane était négligeable aux FI testés. De plus, que ce soit en présence ou en l'absence de kynurénine, aucune différence significative n'a été obtenue dans l'activité phagocytaire des neutrophiles humains (**Figure 38A**). Ces résultats suggèrent

donc que la kynurénine n'a pas d'effet sur la phagocytose par les neutrophiles. Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment, montrant que même après stimulation par le PMA (un activateur soluble qui n'a pas besoin d'être phagocyté) la kynurénine entraîne une inhibition de la production de FRO (**Figure 36D**).

Pour déterminer si la kynurénine a un effet inhibiteur direct sur la NADPH oxydase, la consommation d'oxygène par ce complexe enzymatique a été suivie par oxygraphie. Les neutrophiles ont été activés par du PMA ou par du zymosan opsonisé, en présence ou en l'absence de kynurénine. Aucune différence significative de la consommation d'oxygène n'a été obtenue (**Figure 38B**). Ceci démontre donc que la kynurénine n'est pas un inhibiteur direct de la NADPH oxydase.

Ces résultats nous ont incités à contrôler si la kynurénine est un "scavenger" direct des FRO. Le système non-enzymatique PMS-NADH a été utilisé pour générer des anions superoxydes, puis l'effet "scavenger" a été évalué par réduction du NBT (**Figure 38C**). Le "scavenging" du peroxyde d'hydrogène a été testé par système Amplex® Red (résorufine) modifié (**Figure 38D**). En plus de la kynurénine, d'autres molécules ont été testées : l'acide kynurénique (un "scavenger" des FRO connu, Lugo-Huitrón et al., 2011), le tryptophane et la N-acétyl cystéine ou l'acide ascorbique (des "scavengers" de référence, **Figure 38C et D**). L'acide kynurénique est la molécule ayant le meilleur effet "scavenger" de l' O_2^- , avec plus de 60% de "scavenging" à 10 mM et environ 80% à 50 mM. La kynurénine est également un "scavenger" des anions superoxydes, mais avec une activité bien moindre : 15% de "scavenging" à 10 mM et 35% à 50 mM. Le tryptophane est la molécule avec l'activité la plus faible. Concernant l' H_2O_2 , l'effet "scavenger" de la kynurénine obtenu est plus prononcé que pour l' O_2^- (50% de "scavenging" avec 10 mM de kynurénine). Le tryptophane a une activité de "scavenging" comparable à la kynurénine. Contrairement aux résultats obtenus pour les anions superoxydes, l'acide kynurénique est un faible "scavenger" de l' H_2O_2 (25% de "scavenging" avec 10 mM d'acide kynurénique). Ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur de la kynurénine sur la production de FRO mesurée en chimioluminescence et par réduction du cytochrome c. En effet, la chimioluminescence permet de mesurer un mélange de FRO incluant l' H_2O_2 alors que le test réalisé avec le cytochrome c est spécifique de l' O_2^- (**Figure 36E et F**).

2.6 *La kynurénine est un scavenger des FRO intra et extracellulaires*

Pour affiner notre compréhension du rôle de la kynurénine bactérienne, nous avons voulu déterminer la localisation du "scavenging" des FRO, en intra ou en extracellulaire, lors de l'activation des neutrophiles humains. Dans un premier temps, la distribution de la production de FRO (intra ou extracellulaires) a été évaluée après stimulation des neutrophiles par la souche WT par chimioluminescence, en présence de divers composants. Le luminol a permis de mesurer la production intra et extracellulaire de FRO (production totale), l'ajout de "scavenger" extracellulaire (la catalase et la SOD) a permis d'évaluer la production intracellulaire uniquement et l'utilisation de l'isoluminol (qui ne peut pas passer la membrane des cellules) à la place du luminol a permis de mesurer la production extracellulaire uniquement (**Figure 39**).

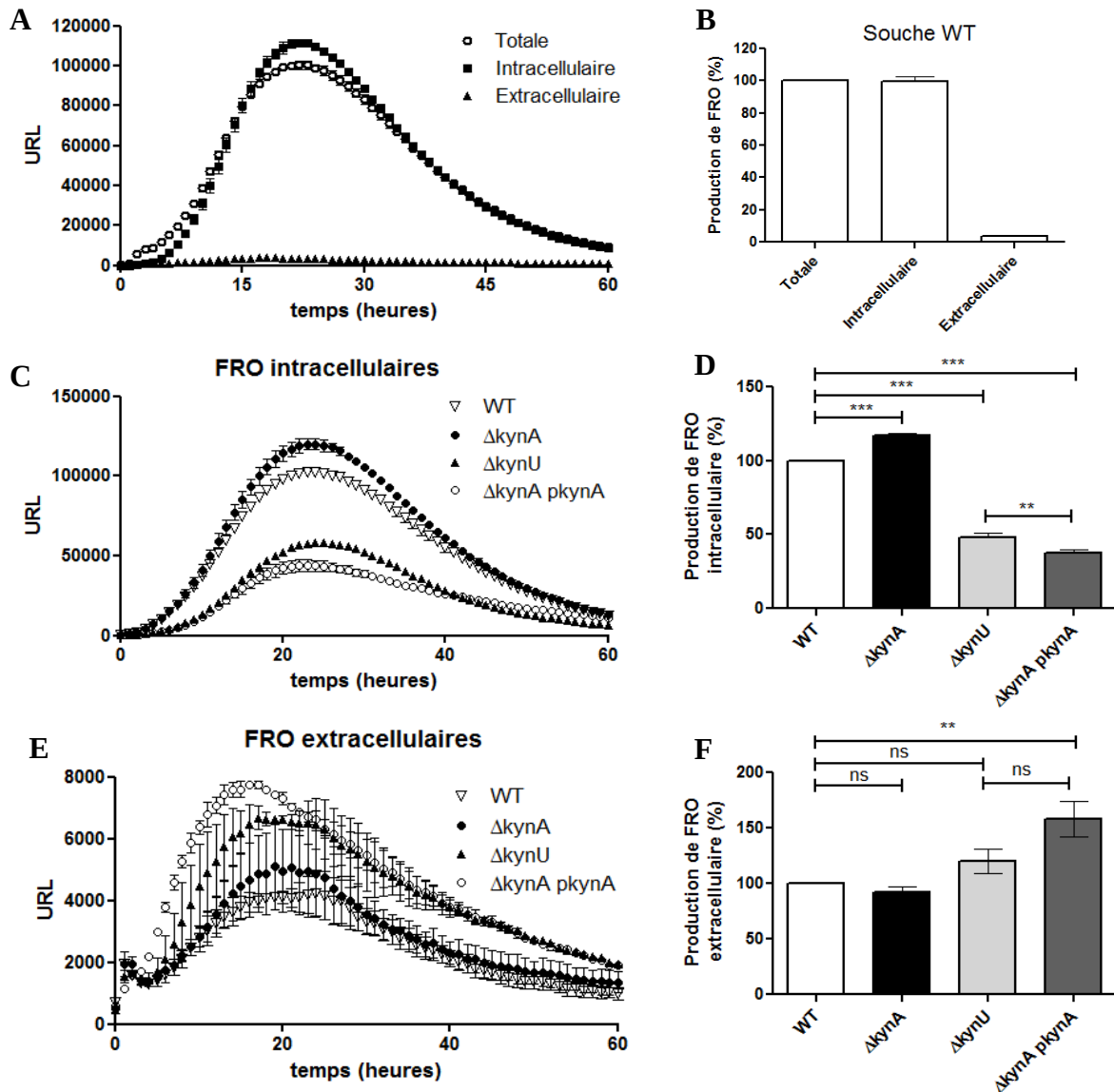


Figure 39 : Scavenging des FRO intra et extracellulaires par la kynurénine bactérienne.

Les neutrophiles humains ont été stimulés par la souche opsonisée WT (A et B). La production totale de FRO est exprimée en somme des URL accumulées en 1h. Les expériences de chimioluminescence ont été réalisées avec du luminol pour détecter la production totale de FRO, en présence de catalase et de SOD pour détecter les FRO intracellulaires uniquement ou avec de l'isoluminol pour détecter la production extracellulaire uniquement. La production de FRO intracellulaires (C, D) ou extracellulaires (E, F) a été mesurée après activation des neutrophiles par des souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine à un FI de 2 (C à F). Les cinétiques sont représentatives d'une expérience sur six réalisées. Les résultats avec une p value de $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) ou non significatifs (ns) sont indiqués (n=6).

Lors de la stimulation des neutrophiles par la souche WT, la production de FRO est principalement intracellulaire, avec seulement 5% de détection en extracellulaire (**Figure 39A et B**). Comme attendu, lors de la mesure de la production de FRO intracellulaires (**Figure 39C et D**), il y a une inhibition des FRO produites par les neutrophiles lors du contact avec les

souches qui accumulent ou surproduisent la kynurénine (souches *ΔkynU* et *ΔkynA pkynA*, 50 et 60% d'inhibition respectivement, $p < 0,001$) comparé à la souche WT. Au contraire, lors du contact avec une souche qui ne produit pas de kynurénine (souche *ΔkynA*), il y a une augmentation de la production de FRO par les neutrophiles (120%, $p < 0,001$). En outre, la kynurénine bactérienne n'a pas d'effet sur la détection de FRO extracellulaires, excepté après activation par la souche *ΔkynA pkynA* (**Figure 39E et F**). Cela montre que la kynurénine bactérienne agit sur les FRO intracellulaires, probablement dans le phagosome.

Pour vérifier si la kynurénine synthétique a le même effet inhibiteur sur la production intracellulaire principalement, les mêmes méthodes de chimioluminescence que celles décrites précédemment ont été utilisées, après stimulation des neutrophiles par le PMA ou le zymosan opsonisé.

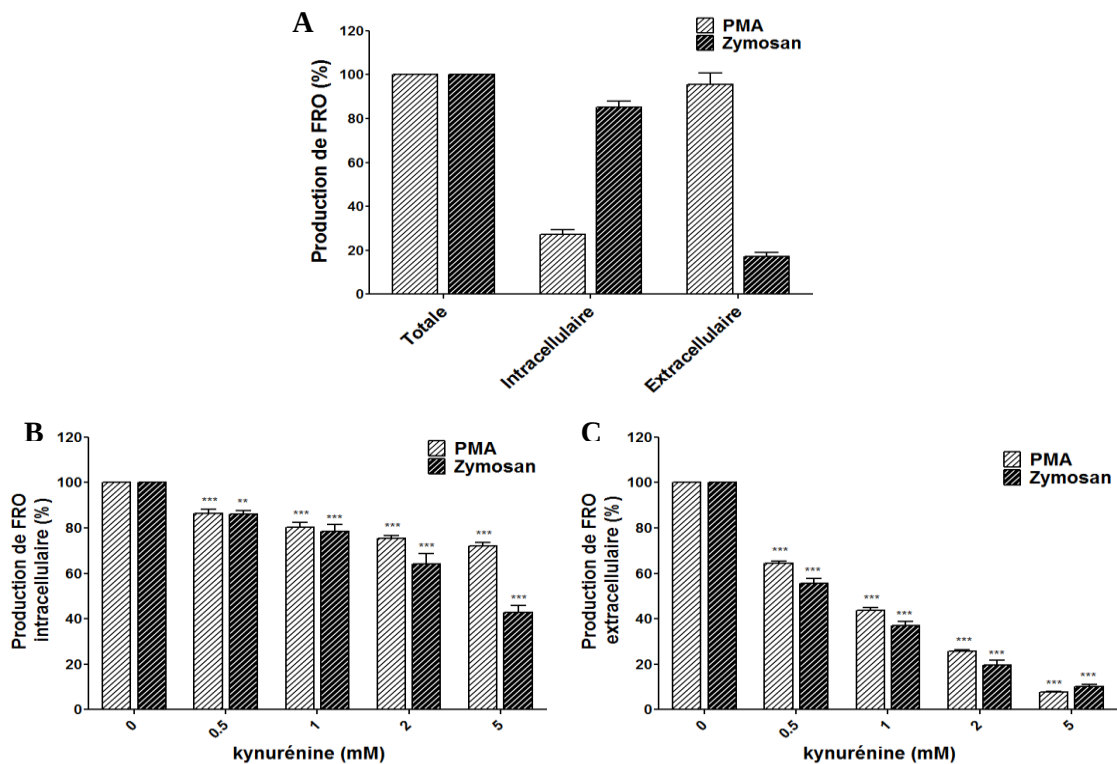


Figure 40 : Scavenging des FRO intra et extracellulaires par la kynurénine synthétique.

Les neutrophiles humains ont été stimulés par du PMA 80 ng/mL ou du zymosan opsonisé 0,64 mg/mL durant 30 min ou 1 h, respectivement. La production totale de FRO est exprimée en somme des URL accumulées en 15 min ou 30 min, après stimulation au PMA ou au zymosan, respectivement. Les expériences de chimioluminescence ont été réalisées avec du luminol pour détecter la production totale de FRO, en présence de catalase et de SOD pour détecter les FRO intracellulaires uniquement ou avec de l'isoluminol pour détecter la production extracellulaire uniquement. La production totale de FRO intracellulaires (B) ou extracellulaires (C) a été mesurée en présence de quantités croissantes en kynurénine dans le milieu. Les résultats avec une p value de $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***) sont indiqués (n=6-8).

Après stimulation des neutrophiles par un activateur particulaire, le zymosan opsonisé, la production de FRO est principalement intracellulaire, avec seulement 15% de production extracellulaire. A l'inverse, après stimulation par un activateur soluble, le PMA, la production de FRO est principalement extracellulaire, avec environ 25% de production intracellulaire seulement (**Figure 40A**). Les quantités croissantes en kynurénine ajoutées dans le milieu conduisent à une diminution proportionnelle et significative de la détection de FRO intracellulaires, quel que soit le stimulus utilisé (**Figure 40B**, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$). Ceci suggère que la kynurénine est capable de traverser la membrane des cellules pour le "scavenging" des FRO intracellulaires. Contrairement aux résultats obtenus avec la kynurénine bactérienne, la kynurénine synthétique ajoutée dans le milieu inhibe fortement la production de FRO extracellulaires (**Figure 40C**). En effet, en présence de 5 mM de kynurénine, il y a environ 90% d'inhibition, que ce soit après activation au PMA ou au zymosan ($p < 0,001$). La kynurénine synthétique ajoutée dans le milieu permet donc un "scavenging" intra et extracellulaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, Stasia MJ. (2014) Free Radic Biol Med 73:400-10.

2.7 La kynurénine bactérienne ne permet pas de résistance directe à l' H_2O_2

Pour mieux comprendre le mode d'action de la kynurénine lors de l'interaction avec les neutrophiles, des traitements des bactéries à l' H_2O_2 en milieu solide et en milieu liquide ont été réalisés. Les bactéries ont été mises au contact avec du peroxyde d'hydrogène en milieu solide (**Figure 41A**) ou en milieu liquide et des pulses ont été réalisés afin de mimer le burst oxydatif des neutrophiles (**Figure 41B**).

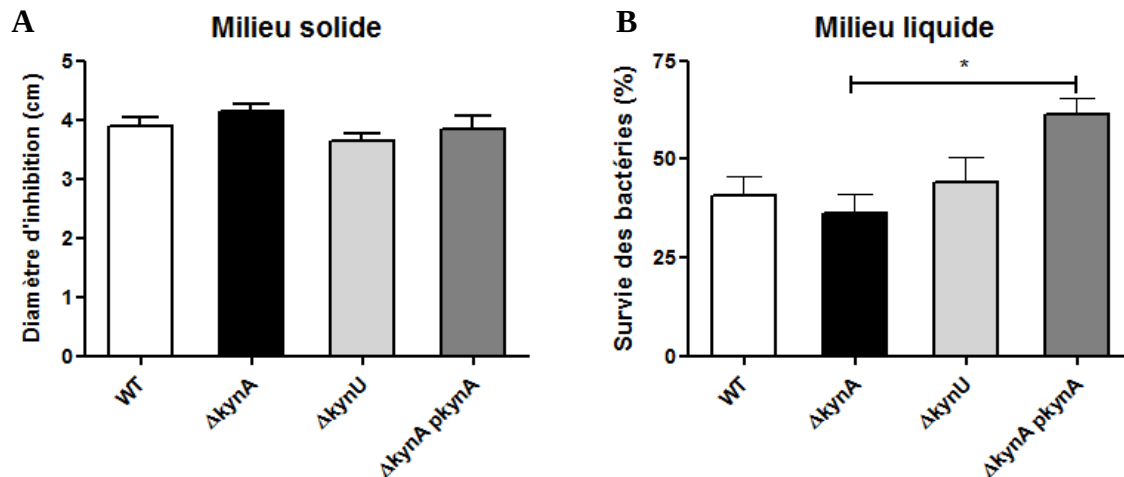


Figure 41 : Traitement des bactéries à l'H₂O₂ en milieu solide (A) ou liquide (B)

(A) Après une culture d'une nuit, les suspensions de bactéries sont ajustées à une DO₆₀₀ de 0,1 puis 100 μ L sont étalés sur LB agar. Un disque stérile de 10 mm est placé au centre de la boîte puis est imbibé par 8 μ L d'H₂O₂ 30%. Les boîtes de Petri sont incubées 36 h à 25°C puis le diamètre d'inhibition est mesuré pour déterminer la résistance des différentes souches de *P. aeruginosa* au peroxyde d'hydrogène (n=4). (B) Les différentes souches de *P. aeruginosa* sont mises en culture à un DO₆₀₀ initiale de 0,2. Une fois en phase exponentielle (DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,6), toutes les 10 min pendant 1 h, 1 mM d'H₂O₂ (ou de l'H₂O pour le contrôle) sont ajoutés dans le milieu de culture (6 mM final). Après 1 h, des dilutions en série sont effectuées et étalées en duplicat sur milieu PIA. Les UFC sont dénombrées après une nuit d'incubation à 37°C. Le pourcentage de bactéries viables est calculé par rapport au nombre d'UFC de la condition contrôle (n=3).

Aucune différence significative n'a été obtenue en milieu solide. En milieu liquide seule la souche Δ kynA pkynA résiste mieux au traitement à l'H₂O₂ comparé à la souche Δ kynA, mais il n'y a pas de différences significatives entre les autres souches mutantes de *P. aeruginosa*. La kynurénine bactérienne ne permet donc pas une résistance directe à l'H₂O₂ dans les conditions testées.

2.8 Les neutrophiles n'expriment pas le récepteur de la kynurénine, contrairement aux lymphocytes, aux monocytes et aux macrophages.

Il a été montré récemment que le récepteur de la kynurénine dans les cellules de l'hôte est le récepteur d'aryl-hydrocarbène (AhR) (Mezrich et al., 2010). Nous avons donc voulu déterminer si, en plus de son effet direct de "scavenging", la kynurénine pourrait également agir de façon indirecte, en se liant aux AhR de la cellule de l'hôte. Pour cela, les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles ont été purifiés à partir de sang humain total. L'expression de ce récepteur par les macrophages issus de monocytes humains a également été évaluée. Les

cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-AhR puis analysées par cytométrie en flux (**Figure 42**).

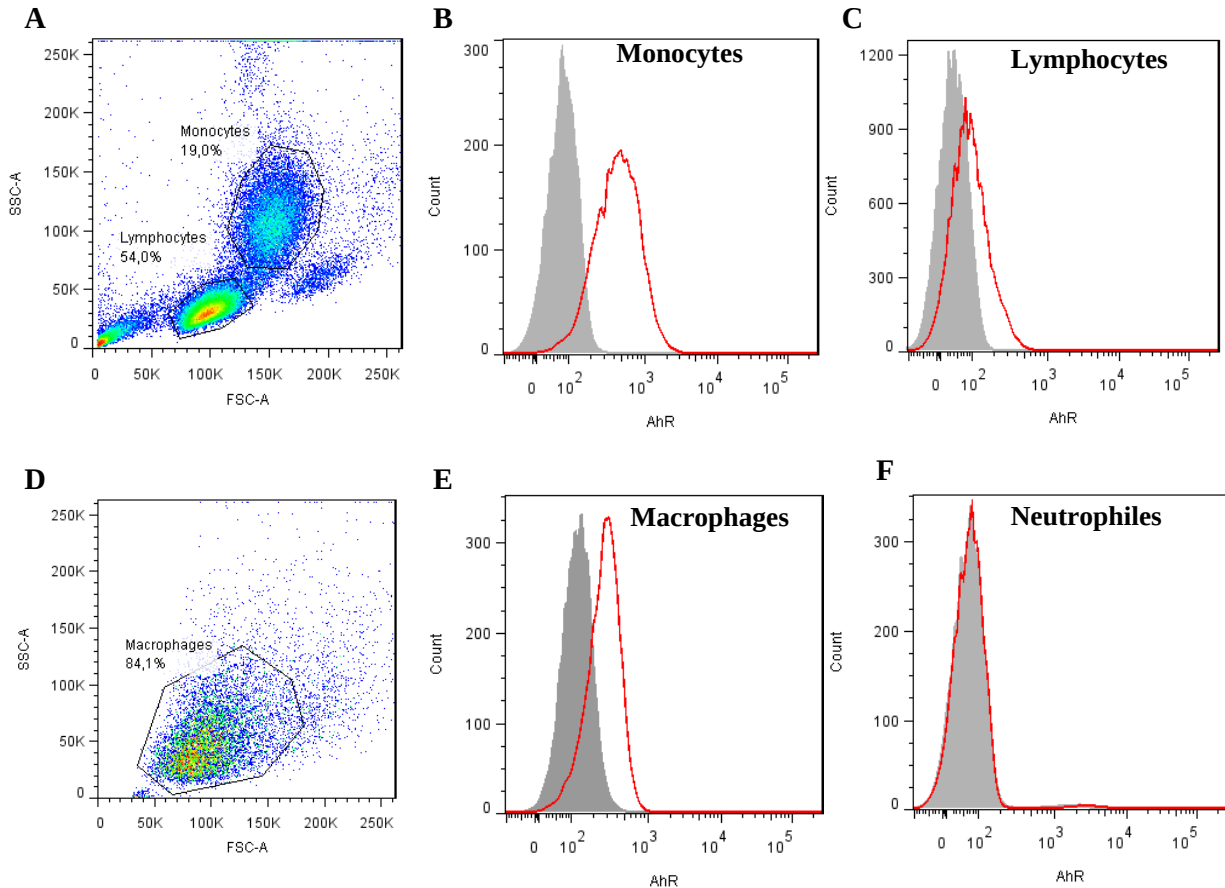


Figure 42 : Expression du récepteur de la kynurénine, l'AhR, par les cellules de l'immunité.

Les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles issus de sang humain total et les macrophages issus de monocytes humains ont été fixés par du PBS-PFA 2%, puis incubés avec un anticorps anti-AhR en présence de 0,01% de saponine. (A et D) Les dot plots représentent la taille et la granulométrie des monocytes des lymphocytes (A) et des macrophages (D). (B, C, E et F) Les courbes grises représentent l'isotype contrôle et les courbes rouges les cellules marquées avec l'anticorps anti-AhR. L'acquisition a été effectuée sur 10 000 évènements pour les neutrophiles et les macrophages et 50 000 évènements pour l'anneau mono-lymphocytaire. Les histogrammes sont représentatifs de 4 à 6 expériences indépendantes.

Les monocytes sont les cellules exprimant le plus fortement les AhR. Les macrophages issus de monocytes humains et les lymphocytes possèdent également ce récepteur, mais l'expriment plus faiblement. A l'inverse, les neutrophiles n'expriment pas ce récepteur de la kynurénine.

2.9 La kynurénine favorise l'expression de l'AhR par les macrophages

Comme nous l'avons vu précédemment, la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est activée lors du contact avec les macrophages. Par la suite, nous nous sommes donc intéressés au rôle de la kynurénine dans l'interaction entre *P. aeruginosa* et les macrophages issus de monocytes humains. Nous avons d'abord étudié l'effet de la kynurénine sur le niveau d'expression de son récepteur, l'AhR, après 48h d'activation par les mutants de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine, ou après activation par du LPS et/ou 100µM de kynurénine (**Figure 43**). Pour l'étude de l'interaction avec les macrophages, les mutants *ΔpopBD* de *P. aeruginosa* ont été utilisés. Ces bactéries, rendues beaucoup moins virulentes par la délétion des protéines de translocation intracellulaire du SST3, ont pu être utilisées à un facteur d'infection plus élevé lors du contact avec les macrophages (facteur d'infection de 5, au lieu d'un facteur d'infection de 1 ou 2 lors des expériences réalisées sur les neutrophiles). Ici la condition "non activés" (NA) correspond aux macrophages qui n'ont pas été mis au contact avec les bactéries, mais pour lesquels du sérum AB humain a tout de même été ajouté dans le milieu, ainsi que la gentamicine utilisée pour tuer les bactéries après 1 h de contact. Pour simuler le contact avec les bactéries, du LPS de *P. aeruginosa* a été utilisé pour activer les macrophages, en présence ou en l'absence de 100 µM de kynurénine synthétique. Ici les macrophages de la condition "non activés" (NA) n'ont reçu aucun traitement.

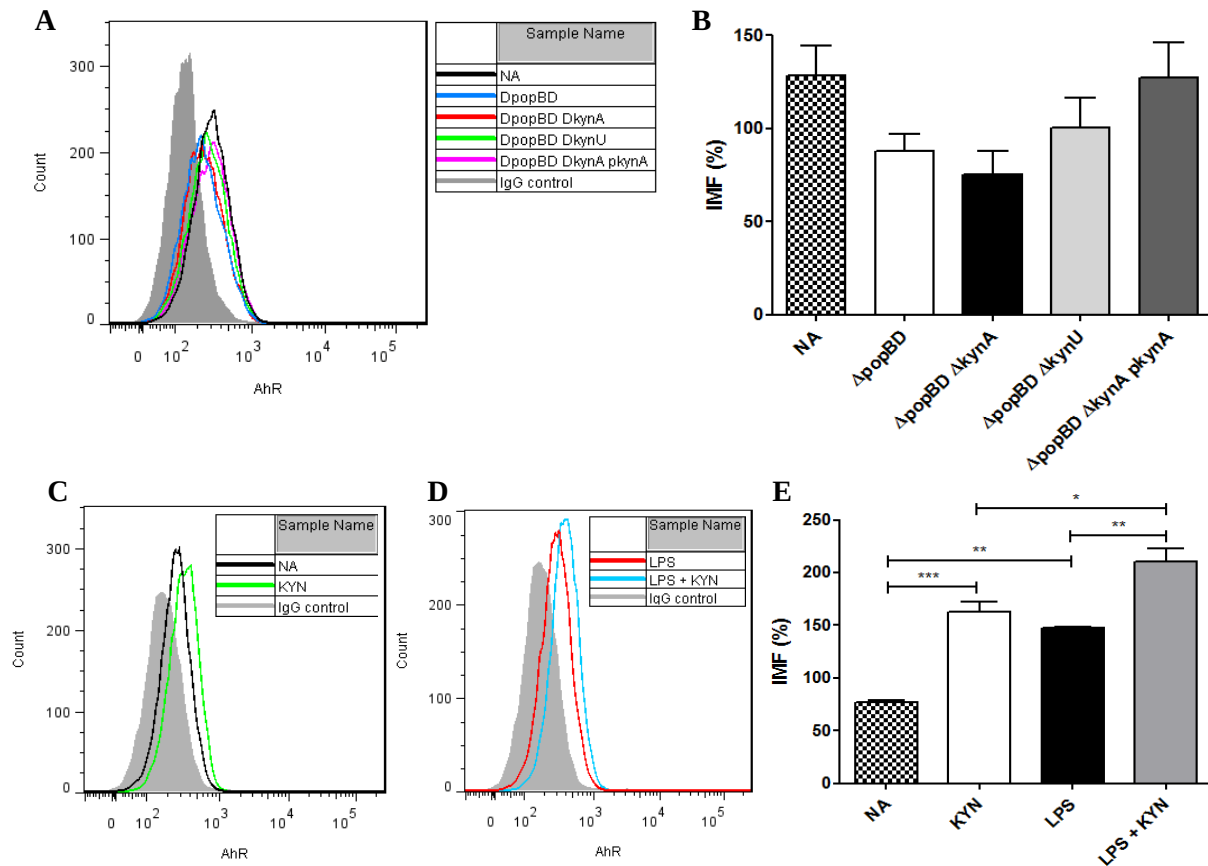


Figure 43 : Effet de la kynurénine sur l'expression des AhR par les macrophages

Les macrophages issus de monocytes humains ont été activés par des mutants opsonisés de *P. aeruginosa* ΔpopBD produisant différents niveaux de kynurénine à un facteur d'infection de 5 (A et B) ou par du LPS 1 µg/mL et/ou 100 µM de kynurénine synthétique (C à E). Après 48 h, les macrophages ont été fixés, perméabilisés, un marquage intra-cellulaire des AhRs a été réalisé puis les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. (A, C et D) La courbe grise représente l'isotype contrôle. Ces histogrammes sont représentatifs de trois expériences réalisées. (B et E) Moyenne géométrique de fluorescence, soustrait de celle du contrôle isotypique. Les valeurs où p<0,05 (*) ; p<0,01 (**) ; p<0,001 (***) sont indiquées (n=3).

Après activation par les bactéries, le niveau d'expression des AhR semble proportionnel à la quantité de kynurénine produite par les différents mutants. Cependant ces différences ne sont pas statistiquement significatives. De plus, l'activation par les bactéries ne semble pas non plus affecter l'expression de ce récepteur (**Figure 43A et B**). Après activation par du LPS et/ou de la kynurénine, des différences significatives ont été obtenues. Comme après activation par les bactéries, la kynurénine a entraîné une augmentation de l'expression des AhR par les macrophages. De plus, l'activation par du LPS induit également une augmentation de l'expression de ce récepteur (**Figure 43C, D et E**). Cette étude préliminaire met en avant que la kynurénine a un impact sur le niveau d'expression des AhR, permettant potentiellement d'amplifier l'effet de cette molécule sur la réponse immunitaire.

2.10 La kynurénine favorise le maintien de la population M2c

Afin de mieux comprendre le rôle de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* lors de l'infection aiguë, nous avons étudié l'interaction avec les macrophages issus de monocytes humains. Ces cellules tiennent un rôle majeur dans la régulation de l'immunité. Il existe deux grandes catégories de macrophages : les macrophages M1 et M2. Les macrophages M1, dits "activés classiquement", ont un rôle dans la réponse pro-inflammatoire, avec des fonctions microbicides très actives et orientent l'immunité vers une réponse Th1. Les macrophages M2, dits "activés alternativement", orientent l'immunité vers une réponse Th2 et peuvent être découpés en trois sous-groupes : M2a, M2b et M2c. Brièvement, les macrophages M2a sont connus pour avoir un rôle profibrotique, les M2b ont un rôle de régulateur de l'immunité, produisant à la fois des cytokines pro et anti-inflammatoires et les M2c ont un rôle important dans la réponse anti-inflammatoire via la sécrétion, entre autre, de TGF- β . Cependant, dans des conditions pathologiques, les macrophages M2 peuvent également servir de médiateur de l'inflammation chronique et de la fibrose tissulaire. C'est l'équilibre entre ces différents types de macrophages qui permet une réponse immunitaire efficace et non délétère pour l'hôte (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008).

Nous avons donc étudié l'effet de la kynurénine bactérienne et synthétique sur la polarisation de macrophages. Pour cela, un triple marquage a été effectué afin de discriminer les macrophages M1, M2a, M2b et M2c. Les marqueurs de polarisation sélectionnés sont le récepteur de chimiokine CCR7, le récepteur du mannose (MR) et le CMH de classe II (HLA-DR). L'expression de ces marqueurs selon la polarisation des macrophages est indiquée dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Marqueurs de la polarisation des macrophages

	M1	M2a	M2b	M2c
CCR7	+	-	-	-
MR	-	+	-	+
HLA-DR	+	+	+	-

Pour déterminer la polarisation des macrophages avant contact avec les bactéries ou le LPS, les macrophages issus de monocytes humains ont été marqués par des anticorps, couplés à des fluorochromes, spécifiques de ces trois marqueurs de surface, puis analysés par cytométrie en flux (**Figure 44**).

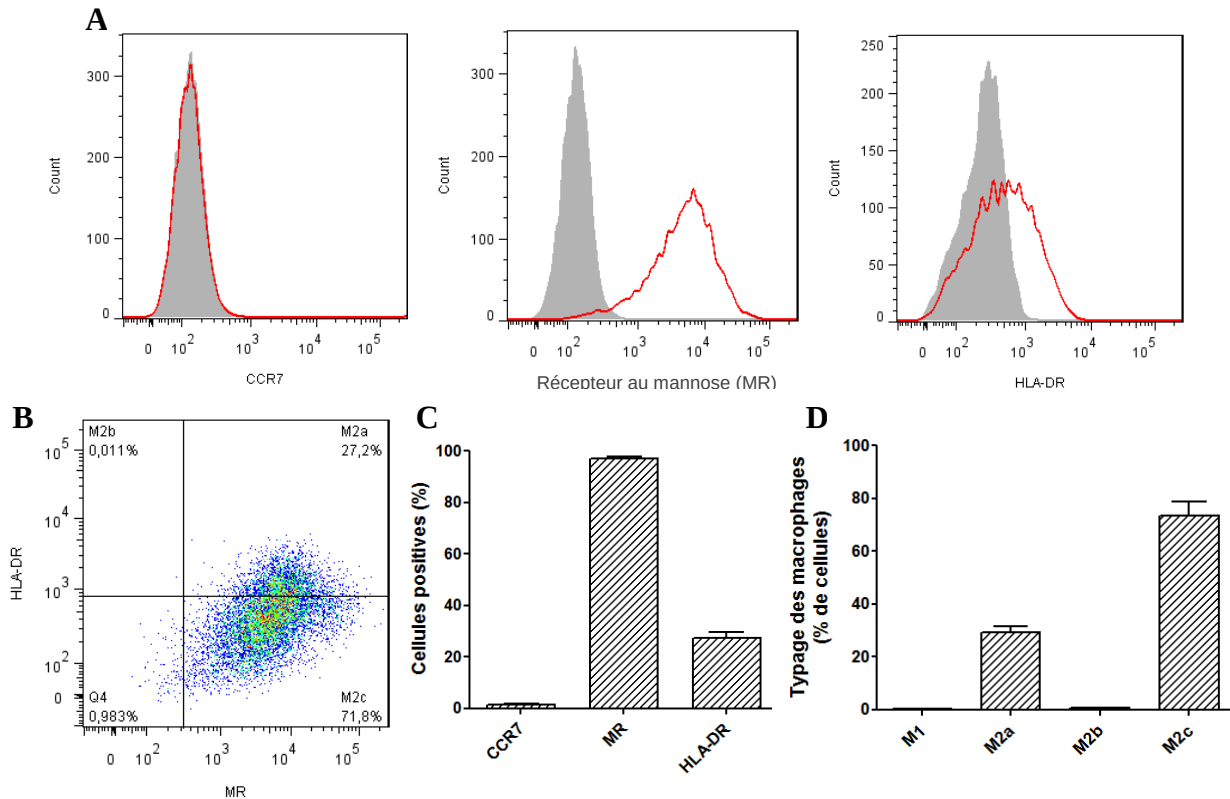


Figure 44 : Polarisation des macrophages issus de monocytes humains.

Les macrophages issus de monocytes humains ont été analysés par cytométrie en flux pour trois marqueurs de la polarisation des macrophages. (A) Les courbes grises représentent les isotypes contrôles spécifiques de chaque marqueurs. Ces histogrammes sont représentatifs de trois expériences réalisées. (B) Le dotplot, réalisé sur la population négative pour le marqueur CCR7, représente la co-expression des marqueurs MR et HLA-DR. Il est représentatif de trois expériences réalisées. (C) Pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs (n=3). (D) Répartition de la polarisation des macrophages (n=3).

La quasi-totalité des macrophages expriment le récepteur au mannose (MR) et 25 à 30% des cellules sont positives pour HLA-DR. Moins de 1% des macrophages obtenus expriment le récepteur CCR7. L'analyse de la co-expression des marqueurs de polarisation MR et HLA-DR dans la population négative pour CCR7 montre que les macrophages obtenus sont majoritairement des M2a (25 à 30%) et des M2c (70 à 80%). Les macrophages M1 et M2b représentent moins de 1% de la population (**Figure 44**).

Dans cette étude préliminaire, l'impact de la kynurénine bactérienne sur la polarisation des macrophages a été analysé après 48h d'activation par les mutants *ΔpopBD* de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine. Comme précédemment, l'expression des trois marqueurs de surfaces CCR7, MR et HLA-DR a été analysée par cytométrie en flux (**Figure 45**).

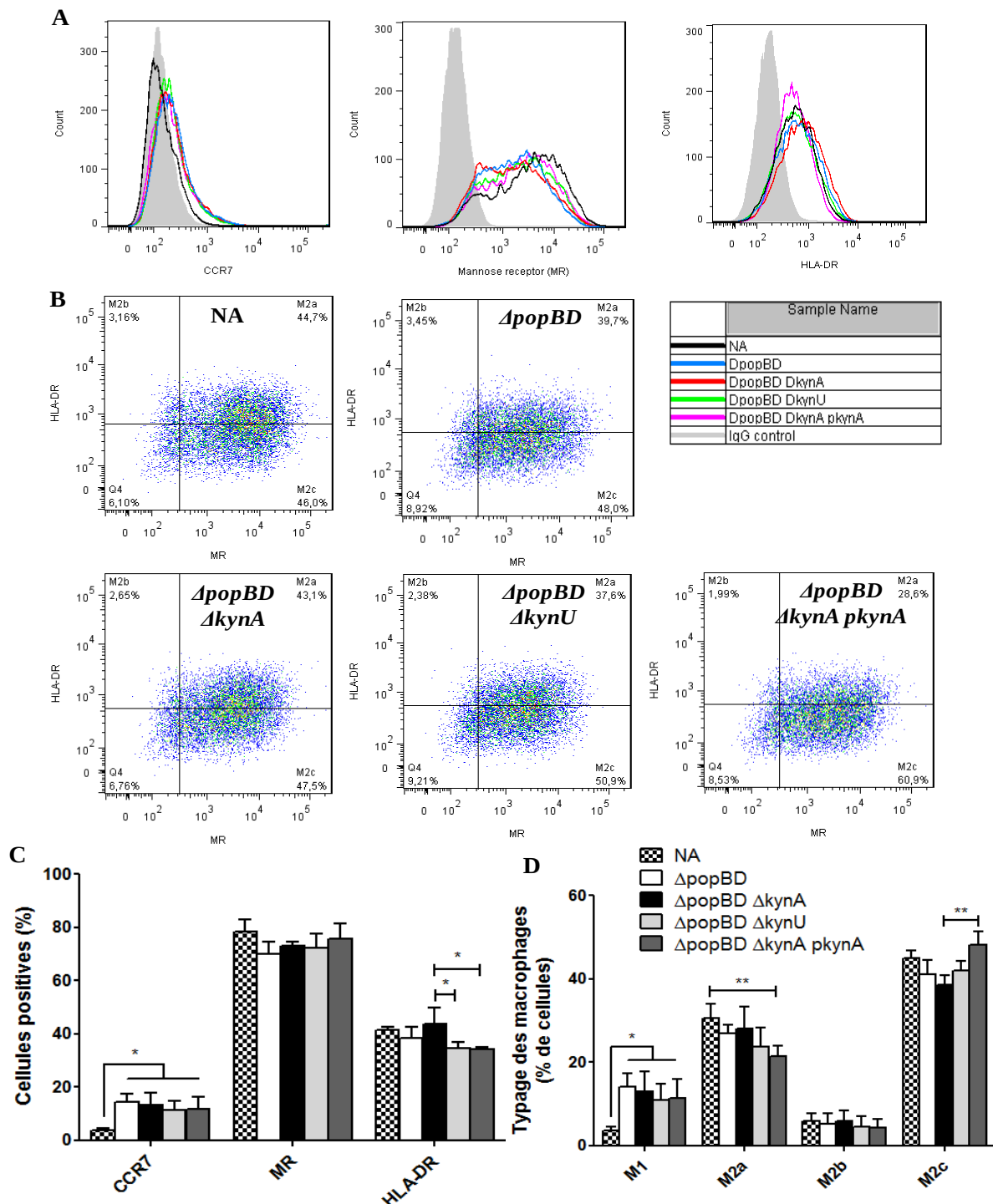


Figure 45 : Effet de la kynurénine bactérienne sur la polarisation des macrophages.

Les macrophages issus de monocytes humains ont été activés par des mutants opsonisés de *P. aeruginosa* $\Delta popBD$ produisant différents niveaux de kynurénine à un facteur d'infection de 5, puis les bactéries ont été tuées après 1 h d'incubation. Après 48 h, les macrophages ont été analysés par cytométrie en flux pour trois marqueurs de la polarisation des macrophages. Les courbes grises représentent les isotypes contrôles spécifiques de chaque marqueur. Ces histogrammes sont représentatifs de trois expériences réalisées. (B) Les dotplots, réalisés sur la population négative pour le marqueur CCR7, représentent la co-expression des marqueurs MR et HLA-DR. Ils sont représentatifs de trois expériences réalisées. (C) Comparaison du pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs. (D) Répartition de la polarisation des macrophages. Les valeurs où $p < 0,05$ (*) ; $p < 0,01$ (**) sont indiquées ($n = 3$).

La stimulation des macrophages par les bactéries entraîne une augmentation du pourcentage de cellules exprimant CCR7, passant de moins de 5% avant activation à 10 à 15% après activation, mais sans effet dépendant de la kynurénine (**Figure 45C**). Concernant le MR, après 48h, il y a apparition d'une double population de cellules, même en l'absence d'activation (condition NA). Les conditions de culture ont donc potentiellement un impact sur la polarisation des macrophages. En effet, il y a une diminution du nombre de cellules positives pour ce marqueur (70 à 80%) comparé aux cellules avant activation (95 à 100% de cellules positives). Cependant, de nouveau, aucun effet significatif de la kynurénine n'a été observé (**Figure 45C**). Pour le HLA-DR, après 48h d'activation, 35 à 45% des cellules sont positives pour ce marqueur. Il y a donc une augmentation de la population HLA-DR positive lors de la culture (25 à 35% de cellules positives avant activation). De plus, un effet significatif de la kynurénine a été obtenu lors de l'activation par les mutants de *P. aeruginosa*. En l'absence de production de kynurénine par les bactéries (souche *ΔpopBD ΔkynA*), davantage de cellules HLA-DR positives ont été obtenues comparé à l'activation par des souches accumulant ou surproduisant la kynurénine (souches *ΔpopBD ΔkynU* et *ΔpopBD ΔkynA pkynA*, respectivement, **Figure 45C**). Ces résultats laissent à penser que la kynurénine inhibe l'augmentation de l'expression de HLA-DR par les macrophages lors de l'activation.

La modification de l'expression de ces différents marqueurs après activation ou en fonction de la kynurénine produite par les bactéries a pour conséquence d'influencer la polarisation des macrophages (**Figure 45D**). L'augmentation de la population exprimant CCR7 après activation bactérienne génère une augmentation de la polarisation en macrophages M1 (10 à 15% des macrophages). Pour la population M2a (20 à 30% des macrophages), il semble qu'il y ait un effet dose dépendant en fonction de la kynurénine, avec une population M2a inversement proportionnelle à la kynurénine produite par les bactéries. Cet effet, bien que non significatif, semble provenir de l'inhibition de l'expression du HLA-DR dans la population positive pour le MR (**Figure 45B et D**). En effet, après 48h, 40 à 50% des macrophages sont polarisés en M2c, comparé à 75 à 80% avant activation. A nouveau, un effet dose dépendant en fonction de la kynurénine est obtenu, avec une population M2c proportionnelle à la kynurénine produite par les bactéries, provenant d'une inhibition du HLA-DR dans la population positive pour le MR (**Figure 45B et D**). Ces résultats suggèrent que la kynurénine "stabiliserait" la polarisation des macrophages en M2c, via l'inhibition de l'expression du HLA-DR dans la population MR positive. Une augmentation de la population M2b a également été obtenue (4 à 6% des macrophages) mais elle ne semble pas affectée par le kynurénine. Par ailleurs, une population négative pour les trois marqueurs est également

observée, correspondant probablement aux macrophages "en transition" lors de l'évolution de la polarisation.

La même expérience a été réalisée après activation des macrophages par du LPS et/ou 100 μ M de kynurénine synthétique. Le même profil a été obtenu (**Figure 46**).

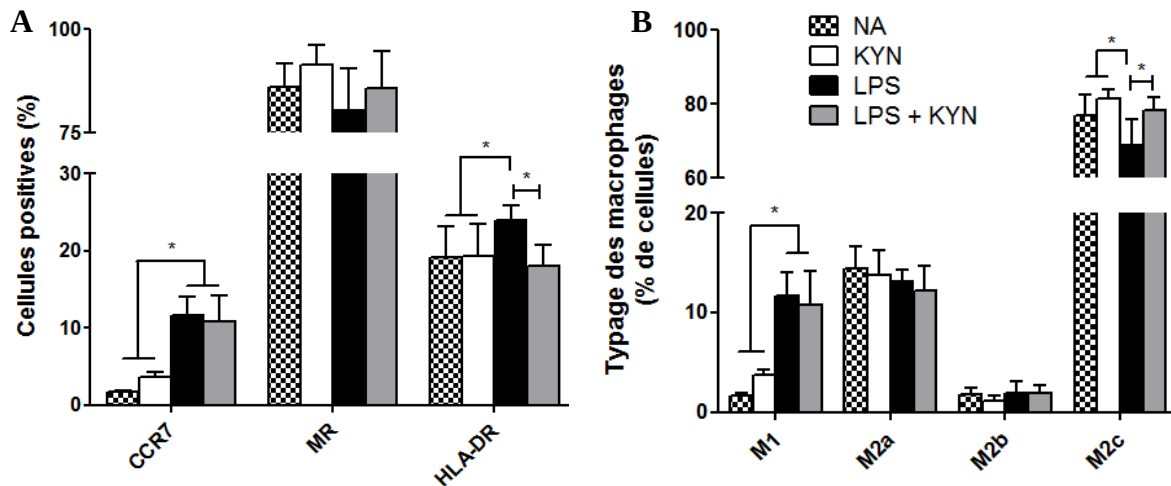


Figure 46 : Effet de la kynurénine synthétique sur la polarisation des macrophages.

Les macrophages issus de monocytes humains ont été activés par du LPS 1 μ g/mL et ou 100 μ M de kynurénine synthétique. Après 48h, les macrophages ont été analysés par cytométrie en flux pour trois marqueurs de la polarisation des macrophages. (A) Comparaison du pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs. (B) Répartition de la polarisation des macrophages. Les valeurs où $p < 0,05$ (*) sont indiquées ($n=3$).

L'activation des cellules par le LPS entraîne une augmentation de la population exprimant CCR7, de façon indépendante de la kynurénine (moins de 5% des macrophages non activés, 10 à 12% après activation). Une double population pour le marqueur du récepteur au mannose (MR) a aussi été obtenue (non montré), mais qui semble uniquement due aux conditions de culture et indépendante de l'activation par le LPS ou de la présence de kynurénine (80 à 90% de cellules positives). Concernant les cellules exprimant le HLA-DR, le même profil est observé après activation par le LPS et/ou la kynurénine qu'après activation par les mutants de *P. aeruginosa*. C'est-à-dire que la kynurénine semble inhiber l'augmentation de l'expression du HLA-DR, lors de l'activation des macrophages par le LPS (environ 20% de cellules HLA-DR positives sans activation ou après activation en présence de kynurénine et 25% de cellules positives après activation par le LPS seul, **Figure 46A**).

Les conséquences sur la polarisation des macrophages, après stimulation par du LPS et/ou de la kynurénine, sont également similaires comparées aux résultats obtenus après stimulation par les mutants de *P. aeruginosa* (**Figure 46B**). Une augmentation de la population des macrophages M1 est observée, ainsi qu'une légère émergence des

macrophages M2b. Les cellules M2a ne sont affectées significativement ni par la kynurénine ni par l'activation par le LPS. A nouveau, le seul effet significatif est obtenu sur les macrophages M2c. Les macrophages activés uniquement par du LPS sont les seuls pour lesquels il y a une diminution significative de la polarisation de cellules en macrophages M2c. La kynurénine, comme décrit précédemment, semble inhiber la transition vers d'autres types de macrophages, avec une "stabilisation" de la population M2c, via l'inhibition de l'expression du HLA-DR dans la population positive pour le MR.

3 Discussion

Lors d'une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*, les cellules de l'immunité innée tiennent un rôle majeur dans la clairance du pathogène (Hartl et al., 2012; Williams et al., 2010). En effet, les souris neutropéniques ont une sensibilité fortement accrue aux infections à *P. aeruginosa* (Koh et al., 2009). De plus, la déplétion en macrophages pulmonaires ou un défaut de recrutement de ces cellules génère une augmentation de la sensibilité aux infections pulmonaires à *P. aeruginosa* et un dérèglement de la réponse immunitaire (Amano et al., 2004; Kooguchi et al., 1998). Chez les patients atteints de mucoviscidose, il y a une accumulation de neutrophiles activés et de macrophages dans les fluides respiratoires (Brennan et al., 2009; Koller et al., 2009). Les neutrophiles consomment activement l'oxygène pour produire des FRO lors d'une infection chronique par *P. aeruginosa* (Kolpen et al., 2010). Par ailleurs, les macrophages de patients atteints de mucoviscidose sont "hyper-réactifs", avec une réponse inflammatoire exacerbée lors d'une stimulation *in vitro* par du LPS (Hartl et al., 2012). Cependant, les cellules de l'immunité échouent à éliminer *P. aeruginosa*. Dans cette étude, nous avons voulu étudier le rôle de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* dans l'échappement à la réponse immunitaire innée et plus spécifiquement le rôle de la kynurénine elle-même. Cette voie du catabolisme oxydatif du tryptophane a déjà été largement étudiée chez l'hôte et elle est connue pour jouer un rôle majeur dans l'homéostasie et la tolérogénicité du système immunitaire. En effet, la voie des kynurénines de l'hôte joue un rôle important dans la tolérance materno-fœtale par exemple, mais aussi dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire (Curti et al., 2009; Harden and Egilmez, 2012; Johnson and Munn, 2012). Dans ce projet, nous avons montré pour la première fois qu'un pathogène (*P. aeruginosa*) utilise la voie des kynurénines pour interagir avec l'hôte et ainsi échapper au système immunitaire inné.

Le premier point indiquant un rôle potentiel de la voie des kynurénines dans le métabolisme et/ou la pathogénicité des bactéries, est que la majorité des souches cliniques de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose produisent de la kynurénine, et en quantité relativement importante. De plus, une forte augmentation de l'activité transcriptionnelle de *kynA* (le premier gène de la voie des kynurénines chez la bactérie) lors du contact avec les cellules de l'immunité, et en particulier les neutrophiles et les macrophages, confirme notre hypothèse : les bactéries ont un mécanisme de régulation pour activer la voie des kynurénines en réponse au contact avec les cellules de l'immunité.

Grâce à l'utilisation de souches bactériennes produisant différents niveaux de kynurénine, nous avons pu mettre en avant que la kynurénine favorise la survie des bactéries durant l'interaction avec les neutrophiles humains. La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* a déjà été étudiée dans la virulence de la bactérie, mais uniquement en tant que précurseur de l'anthranilate (Chugani and Greenberg, 2010; Farrow and Pesci, 2007). Cependant, nous avons été les premiers à démontrer que la kynurénine, en soi, pourrait participer à la virulence bactérienne. De plus l'effet de la kynurénine sur les fonctions des neutrophiles n'a été que peu étudié. Un déséquilibre dans la régulation de la voie des kynurénines chez l'hôte, qui a un rôle important dans la résolution de l'inflammation, a été proposé pour expliquer le profil auto-inflammatoire des patients atteints de granulomatose septique chronique (CGD). Cependant, ce rôle est encore débattu (Jürgens et al., 2010; De Ravin et al., 2010; Romani et al., 2008). L'impact de la voie des kynurénines de l'hôte sur l'activité fongicide des neutrophiles a été brièvement traité dans un seul article (Bozza et al., 2005). Il a été montré qu'en présence de 1-méthyl-tryptophane, un inhibiteur de l'IDO (l'homologue de KynA chez l'hôte), il y a une diminution de l'activité phagocytaire et fongicide des neutrophiles et, paradoxalement, une diminution de la production de FRO ainsi que de l'apoptose, durant le contact entre les neutrophiles de souris et *Candida albicans*. Ces résultats semblent être partiellement en contradiction avec les nôtres, mais plusieurs différences dans la démarche expérimentale peuvent expliquer ceci : premièrement, Bozza et ses collaborateurs ont étudié la production de kynurénine par les neutrophiles, alors que nous avons étudié l'impact de la kynurénine bactérienne ou de la kynurénine synthétique ajoutée dans le milieu. Deuxièmement, l'inhibiteur de l'IDO utilisé par cette équipe, le 1MT, peut avoir des effets secondaires, comme l'inhibition du transporteur du tryptophane de la membrane cellulaire (Kudo and Boyd, 2001).

Nous avons également étudié les mécanismes moléculaires par lesquels la kynurénine permet l'échappement à l'activité bactéricide des neutrophiles humains. Nous avons démontré

que la kynurénine produite par *P. aeruginosa* participe à la résistance vis à vis de l'activité bactéricide des neutrophiles. La kynurénine bactérienne (produite par les différentes souches mutantes de *P. aeruginosa*) ou synthétique inhibe la détection ou la production de FRO par les neutrophiles, quel que soit le stimulus utilisé (un activateur particulière tel que les bactéries ou le zymosan ou un activateur soluble tel que le PMA). Cette inhibition n'est due ni à un défaut de phagocytose, ni à une inactivation directe de la NADPH oxydase. La kynurénine est en fait un "scavenger" des FRO, principalement du peroxyde d'hydrogène et, dans une moindre mesure, des anions superoxydes. L'acide kynurénique, un autre métabolite de la voie des kynurénine, qui est un "scavenger" des FRO connu (Lugo-Huitrón et al., 2011), est un faible "scavenger" du peroxyde d'hydrogène, mais un fort "scavenger" des anions superoxydes, contrairement à la kynurénine. Il serait donc intéressant de tester d'autres dérivés du métabolisme oxydatif du tryptophane comme inhibiteurs du stress oxydant, comme la 3-hydroxy-kynurénine ou le 3-hydroxy-anthranylate. De plus, nous avons confirmé que les neutrophiles n'expriment pas le récepteur de la kynurénine, l'Ahr, comme cela avait été montré précédemment (Platzer et al., 2009). Ceci renforce l'idée que la kynurénine produite par *P. aeruginosa* agit de façon directe sur l'activité bactéricide des neutrophiles via le "scavenging" des FRO et non par un mécanisme récepteur dépendant.

Nous avons également montré que ce scavenging a lieu principalement en intracellulaire après la stimulation des neutrophiles par les bactéries, suggérant une action dans le phagosome. Parallèlement, des concentrations de l'ordre du millimolaire de kynurénine synthétique sont nécessaires pour mimer le rôle de la kynurénine bactérienne lors du contact avec les neutrophiles. Cela suggère qu'une forte concentration locale en kynurénine est probablement nécessaire aux bactéries pour échapper à l'activité bactéricide des neutrophiles. Une concentration locale élevée en kynurénine pourrait être maintenue via une rétroaction positive de l'activation de la voie des kynurénines par son régulateur, KynR. KynR interagit avec la kynurénine afin d'activer le promoteur *kynA* (le premier gène de la voie des kynurénines). Notre hypothèse est qu'il y a une initiation de la production de kynurénine lors du premier contact avec les neutrophiles et, par la suite, la kynurénine produite interagit avec KynR, conduisant à une régulation positive de la voie des kynurénines au niveau transcriptionnel. Par ailleurs, il a également été montré que les FRO peuvent être un régulateur de la TDO (homologue de KynA). En effet, les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène peuvent réduire l'enzyme de sa forme ferreuse inactive à sa forme ferrique active, induisant l'activité de la TDO. Cela renforce l'hypothèse d'une concentration locale

élevée en kynurénine, avec une régulation au niveau enzymatique. Cependant, il a également été montré qu'une accumulation de FRO inhibe cette enzyme (Fu et al., 2011; Li et al., 2007).

Nous avons également montré que, dans les conditions testées, la kynurénine produite par les bactéries ne permettait pas de résistance directe au peroxyde d'hydrogène. Ceci génère plusieurs hypothèses. Premièrement, les conditions de réalisation du traitement des bactéries à l'H₂O₂ ne permettaient pas de mettre suffisamment en avant ce phénomène de résistance. Deuxièmement, la meilleure survie des bactéries observée lors du contact avec les neutrophiles pourrait être due à l'impact de l'inhibition des FRO sur d'autres mécanismes de microbicidie de ces cellules. Troisièmement, l'H₂O₂, bien que connu pour avoir un rôle dans la régulation des homologues fonctionnels de KynA au niveau enzymatique, comme expliqué précédemment, n'a peut-être pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de la voie des kynurénines. La dernière hypothèse est soutenue par le fait que seule la souche *ΔkynA pkynA*, dont l'activation de la voie des kynurénines est inductible à l'IPTG, a une résistance plus importante que les autres mutants. L'enzyme KynA, produite de façon constitutive, est donc potentiellement activée par l'H₂O₂, entraînant une meilleure résistance de la souche *ΔkynA pkynA*, via la kynurénine produite. Il est possible que ce soit le contact avec les cellules de l'immunité, et non les FRO, qui induit l'activation transcriptionnelle de gène *kynA*.

Comme indiqué plus haut, le "scavenging" des FRO par la kynurénine pourrait avoir d'autres effets délétères sur les fonctions des neutrophiles et donc sur la clairance bactérienne. La conversion du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par la myelopéroxydase, un produit possédant un fort pouvoir bactéricide impliqué dans la clairance de *P. aeruginosa* (Kaslovsky et al., 1991; Klebanoff, 2005), pourrait être affecté par le "scavenging" de l'H₂O₂ par la kynurénine. La NETose, un phénomène de décondensation de la chromatine qui permet de piéger et tuer les bactéries, est également dépendant des FRO et impliqué dans l'élimination de *P. aeruginosa* (Rada et al., 2013). S'il y a un déficit des FRO (via le "scavenging" par la kynurénine), les NETs pourraient ne pas être générés efficacement de façon à piéger et tuer les bactéries. En effet, les patients atteints de CGD, ayant une altération de l'activité NADPH oxydase, possèdent des neutrophiles présentant une activité antimicrobienne très faible, incluant une incapacité à générer des NETs (Bianchi et al., 2009). De même, les FRO jouent un rôle dans la signalisation cellulaire, telle que la régulation réversible de différentes cibles (incluant les phosphatases, les metalloprotéinases et les caspases) par une oxydation directe des résidus cystéine (Amulic et al., 2012; Nathan, 2003). D'autres mécanismes de bactéricidie et de signalisation des neutrophiles restent donc à

explorer afin de comprendre pleinement l'amélioration de la survie des bactéries via la kynurénine.

L'expression des AhR a également été analysée chez les macrophages issus de monocytes humains. Après activation par des souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine et par du LPS et/ou de la kynurénine synthétique, une augmentation modérée de l'expression de ce récepteur a été observée de façon dépendante de la kynurénine. Cependant, il faudrait vérifier si la perméabilisation à la saponine permet d'accéder aux protéines nucléaires. En effet, une fois lié à la kynurénine, l'AhR est transloqué dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. Il reste donc à confirmer qu'il ne s'agit pas d'une inhibition de la translocation des AhR dans le noyau et une étude plus approfondie est nécessaire. De plus, il faudrait tester des doses croissantes en kynurénine synthétique pour confirmer l'effet obtenu.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la polarisation des macrophages. Il a été mis en avant que, dans les lavages broncho-alvéolaires et les expectorations de patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa*, les marqueurs révélant une polarisation en macrophages M2 sont accentués et ceux révélant une polarisation en macrophages M1 sont diminués (Murphy et al., 2010). Par ailleurs, des études ont montrées que la voie des kynurénines de l'hôte induit une polarisation des macrophages en M2 (François et al., 2012; Mei et al., 2014; Wang et al., 2014b). Par exemple, la transfection des macrophages THP-1 avec un plasmide surexprimant l'IDO, la première enzyme de la voie des kynurénines chez l'hôte, entraîne une polarisation des macrophages en M2. A l'inverse, l'inhibition de cette enzyme, et donc de la voie des kynurénines, entraîne une polarisation des macrophages en M1 (Wang et al., 2014b). Cela nous a incité à étudier l'effet de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* sur la polarisation des macrophages lors de l'interaction hôte-pathogène. Pour cela, des monocytes humains ont été différenciés en macrophages *ex vivo* en présence de GM-CSF. Etrangement, bien que la différenciation en présence de GM-CSF, contrairement au M-CSF, soit connue pour générer des macrophages M1, nous avons obtenu des macrophages M2 (Lacey et al., 2012; Rey-Giraud et al., 2012). Cela pourrait s'expliquer par le temps de culture de 7 jours, relativement long, qui entraîne probablement la sécrétion par les cellules d'autres facteurs de croissance, favorisant ainsi l'orientation de la polarisation des macrophages en M2. Cela pourrait également venir du fait qu'il s'agisse de monocytes issus de patients atteints d'hémochromatose. Les monocytes ne représentant que 2 à 6% des leucocytes, des quantités relativement importantes de sang ont été nécessaires. C'est pourquoi ce travail a été

réalisé sur le sang de trois patients atteints d'hémochromatose. Cette maladie est caractérisée par une absorption et un stockage excessifs de fer dans l'organisme, qui pourrait avoir favorisé une polarisation en macrophage M2. Il serait donc intéressant d'optimiser la méthode de différenciation des macrophages afin de pouvoir tester l'effet de la kynurénine sur les macrophages M1 et/ou sur une population plus homogène de macrophages M2. L'utilisation de doses de facteurs de croissances plus élevées et sur des temps plus courts serait à tester.

Dans cette étude préliminaire, nous avons analysé la polarisation des macrophages après une activation de 48h, par les souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine ou par du LPS et/ou de la kynurénine synthétique. Nous avons observé une inhibition modérée de la régulation positive de l'expression du HLA-DR par la kynurénine. Cette inhibition a lieu dans la population positive pour le récepteur au mannose. Ceci entraîne, lors de l'activation, une stabilisation par la kynurénine de la polarisation en macrophages M2c, au détriment des macrophages M2a. Cela pourrait faire partie des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de *P. aeruginosa*, en induisant une tolérance du système immunitaire. Cependant, la kynurénine n'a pas d'effet sur la polarisation des macrophages en M1. L'ajout de cytokines pro-inflammatoires lors de l'interaction hôte-pathogène, comme l'IFN- γ ou le TNF- α et l'IL-6 par exemple, pourrait permettre d'exacerber l'activation des macrophages, amplifiant potentiellement les effets observés. Des doses croissantes en kynurénine synthétique lors de l'activation des macrophages par du LPS permettrait de confirmer les résultats obtenus. Pour caractériser au mieux la polarisation des macrophages et leur influence potentielle sur la réponse immunitaire, la sécrétion de cytokines et chimiokines serait également à étudier.

Par ailleurs, le rôle d'un "scavenger" des FRO, le butylhydroxyanisole (BHA), a été étudié dans le cadre de la différenciation des monocytes en macrophages (Zhang et al., 2013). Cette étude montre que l'inhibition des FRO entraîne une inhibition de la différenciation des monocytes en macrophages. L'ajout de peroxyde d'hydrogène restaure partiellement cette différenciation. Le BHA et d'autres "scavengers" des FRO inhibent également l'activation des macrophages M2, mais pas des macrophages M1 (Zhang et al., 2013). Les FRO semblent donc jouer un rôle important dans la différenciation et la polarisation des macrophages, en particulier des macrophages M2. L'impact de la kynurénine bactérienne, en tant que "scavenger" des FRO, serait donc également à étudier. Pour conclure, bien que la kynurénine n'ait qu'un effet restreint sur les macrophages dans ces conditions d'analyse, il serait intéressant de poursuivre cette étude en optimisant les conditions de différenciation et d'activation des macrophages.

PARTIE II : ETUDE ENZYMOLOGIQUE DE KYNA

Des travaux de notre laboratoire ont démontré que la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* a un rôle dans la virulence de la bactérie (Chaker, 2012). Lors d'une infection pulmonaire aiguë chez la souris, si une souche bactérienne ne produit pas de kynurénine (délétion du premier gène de la voie de synthèse des kynurénines), une diminution de la mortalité et des facteurs de virulence (perte de poids, perméabilité pulmonaire et charge bactérienne pulmonaire) a été observée. De plus, nous avons montré au cours de ce projet que la kynurénine produite par *P. aeruginosa* pourrait permettre aux bactéries de mettre en échec la première ligne de défense du système immunitaire, via un "scavenging" des espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles et via une orientation de la polarisation des macrophages vers un phénotype immuno-régulateur. Cela nous a donc amené à penser que la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est une cible thérapeutique potentielle.

C'est pourquoi la première enzyme de la voie des kynurénines, KynA, a été produite et purifiée. Cette protéine fait partie de la famille des tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO), et permet la conversion du L-tryptophane en N-formyl-kynurénine (NKF). Son étude permettra de mieux comprendre la régulation de cette voie de signalisation. De plus, il s'agit d'un nouvel outil (cette enzyme n'ayant jamais été purifiée chez *P. aeruginosa*) qui permettra de pouvoir cribler des inhibiteurs spécifiques comme molécules thérapeutiques potentielles.

1 Production, purification et conservation de l'enzyme recombinante KynA

1.1 Mise au point de la purification de l'enzyme recombinante KynA

Nous avons choisi d'exprimer la protéine KynA dans un système *E. coli* BL21, sous forme d'une protéine portant une étiquette poly-histidine. Une induction par 1 mM d'IPTG pendant 20h à 16°C a été choisie pour la production de la protéine recombinante par les bactéries BL21 pET15b KynA. Des homologues de l'enzyme KynA de *P. aeruginosa* ayant déjà été purifiés (Capece et al., 2011; Yuasa et al., 2011), cela a permis de déterminer plusieurs éléments importants pour garder l'enzyme stable tout au long de la purification. Pour une meilleure stabilité de l'enzyme, du glycérol 5% et du L-tryptophane 10 mM (le substrat de l'enzyme) ont été ajoutés dans le tampon d'élution. De plus, afin que l'enzyme reste sous sa forme ferrique, inactive, le tampon d'élution contenait également du ferricyanure de potassium 0,5 mM. Par ailleurs, des doses croissantes en imidazole (la molécule entrant en

compétition avec l'histidine pour décrocher la protéine d'intérêt de la colonne de nickel) ont été testées. Le lavage de la colonne a été optimal avec de l'imidazole 50mM, afin d'éliminer un maximum de contaminants (malgré une légère perte de la protéine d'intérêt). Pour l'élution de l'imidazole 300mM permettait d'obtenir une protéine très concentrée dans les premières fractions d'élution (qui sont les seules conservées pour la suite des expériences). Un aliquot des différentes fractions a été récupéré à chaque étape de la purification afin d'être analysé sur gel SDS-PAGE et par Western blot (**Figure 47**).

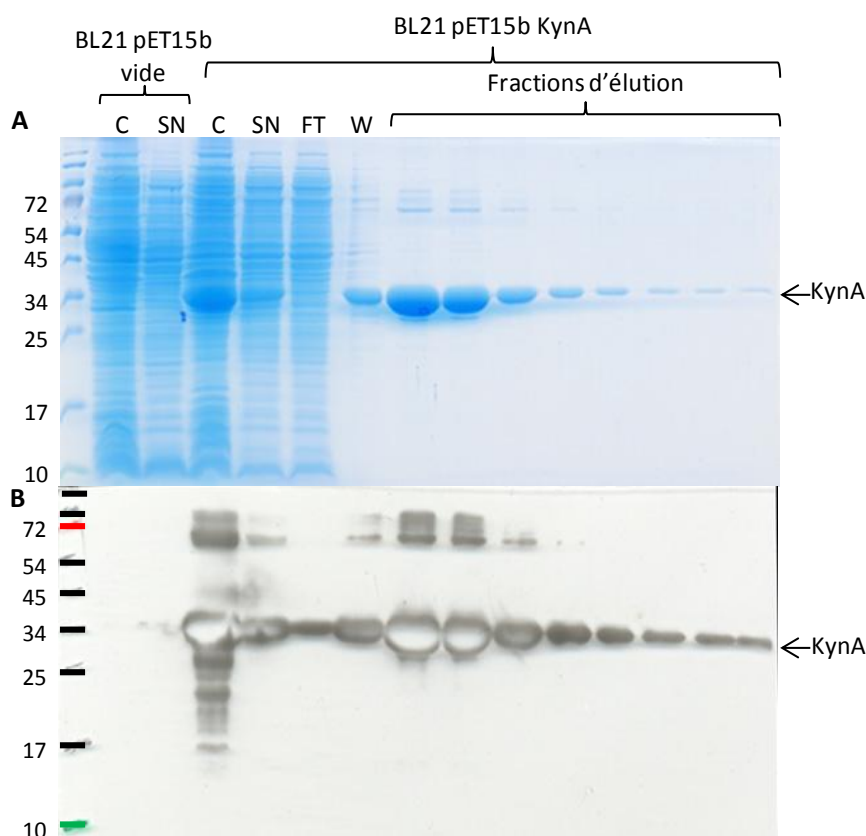


Figure 47 : Purification de la protéine recombinante KynA.

La surexpression de protéine a été induite par 1mM d'IPTG 20 h à 16°C, dans des bactéries BL21 transformées avec le plasmide pET15b vide (contrôle) ou pET15b KynA. Après lyse des bactéries et centrifugation, le surnageant (SN) et le culot (C) ont été récupérés. Après passage du surnageant sur colonne de nickel, à chaque étape (en sortie de colonne (FT), après lavage (W), et durant l'élution), un aliquot a été récupéré pour être analysé par gel SDS-PAGE (A) et par Western blot (B).

1.2 Mise au point de la conservation de l'enzyme recombinante KynA

Un autre point important pour l'étude de l'enzyme recombinante KynA a été l'optimisation du tampon de conservation de cette protéine. Une concentration relativement importante en sel est nécessaire pour une bonne stabilité de cette enzyme [tampon phosphate

contenant 150mM de KCl (Yuasa et al., 2011) ou PBS contenant 420mM de NaCl (Capece et al., 2011)]. Cependant, obtenant une activité spécifique de l'enzyme relativement faible lors des premiers essais, nous avons testé d'autres conditions de conservation afin de voir s'il était possible d'obtenir de meilleurs résultats. Pour cela, plusieurs composés ont été testés :

- L'ascorbate, connu pour réduire l'enzyme KynA à sa forme ferreuse, active
- Le ferricyanure de potassium, pour maintenir la protéine sous sa forme ferrique, inactive
- Le Tween 20, un détergent non ionique, connu pour favoriser la stabilité des protéines

L'activité spécifique de l'enzyme recombinante KynA a été testée avec une concentration en substrat saturante de 50mM de L-tryptophane (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Comparaison de l'activité enzymatique de la protéine recombinante KynA après stockage dans différents tampon de conservation.

Tampon de conservation	Vi/mol d'ez 50mM trp
Tampon phosphate pH 7.4 + 150 mM KCl	0,50
Tampon phosphate pH 7.4 + 150 mM KCl + Tween20 0,05% + Ascorbate 20 mM	0,89
PBS contenant 420 mM NaCl + Tween20 0,05%	2,74
PBS contenant 420 mM NaCl + Ferricyanure de potassium 0,5 mM	4,09
PBS contenant 420 mM NaCl + Tween20 0.05% + Ferricyanure de potassium 0,5 mM	1,91

L'ajout d'ascorbate dans le tampon de conservation de l'enzyme a été abandonné, car, même s'il y a eu une amélioration de l'activité spécifique, la protéine précipite dans ces conditions-là. L'ajout de Tween 20 ou de ferricyanure de potassium a également permis d'améliorer l'activité spécifique de l'enzyme. Le fait de conserver l'enzyme sous forme inactive, via le ferricyanure de potassium, permet visiblement une meilleure conservation de la protéine recombinante KynA. Étonnamment, le fait de conjuguer les deux composés n'améliore pas les résultats obtenus, au contraire. En effet, l'activité de l'enzyme diminue lorsqu'elle est conservée en présence de ces deux composés, comparée à l'activité obtenue en utilisant uniquement du Tween 20 ou du ferricyanure de potassium.

Grâce à cette mise au point, nous avons pu améliorer d'un facteur 8 environ l'activité spécifique de notre enzyme comparée au tampon phosphate contenant 150mM de KCl utilisé en première instance (**Tableau 7**).

1.3 Critères de pureté de l'enzyme recombinante KynA

Suite à ces mises au point, les critères de pureté de la protéine recombinante KynA ont pu être évalués. Pour cela, la concentration en protéine des échantillons et leurs activités enzymatique ont été mesurées avant et après la purification sur colonne de nickel afin d'en déduire le facteur de purification et le rendement. Pour les tests d'activité, 100 μ L d'enzyme purifiée ou de surnageant du lysat bactérien ont été utilisés (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Critères de pureté de la protéine recombinante KynA.

	[protéine]	Activité enzymatique	Activité spécifique	Facteur de purification	Rendement
Unités	mg/mL	μ M NFK/min	μ M NFK / min / mg protéines		%
Surnageant lysat bactérien	3,676	8,984	24,4		
KynA purifiée	0,696	8,747	125,7	5,2	97

Le facteur de purification semble plutôt faible étant donné les résultats observés sur gel SDS-PAGE (**Figure 47**). Cela pourrait venir du fait que le surnageant du lysat bactérien contient des molécules permettant de stabiliser l'enzyme et/ou d'améliorer l'activité de KynA. Cela entraînerait donc une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme au cours de la purification. Le rendement obtenu est très élevé. Bien qu'il y ait une perte de la protéine après passage du surnageant du lysat bactérien sur colonne de nickel (**Figure 47**, fraction FT) et après lavage (**Figure 47**, fraction W), elle semble minime comparé à la quantité de protéine récupérée dans les fractions d'élution.

2 La protéine recombinante KynA est une enzyme allostérique

Afin de mieux comprendre la régulation de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*, la cinétique enzymatique de la protéine recombinante KynA (la première enzyme de la voie des kynurénines) a été étudiée. Pour cela, la vitesse initiale de KynA a été suivie dans un milieu réactionnel contenant de l'ascorbate (permettant que l'enzyme soit sous sa forme ferreuse, active), en présence de concentrations croissantes en L-tryptophane (**Figure 48**). Les courbes obtenues ont été générées grâce au logiciel GraphPad Prism 5.

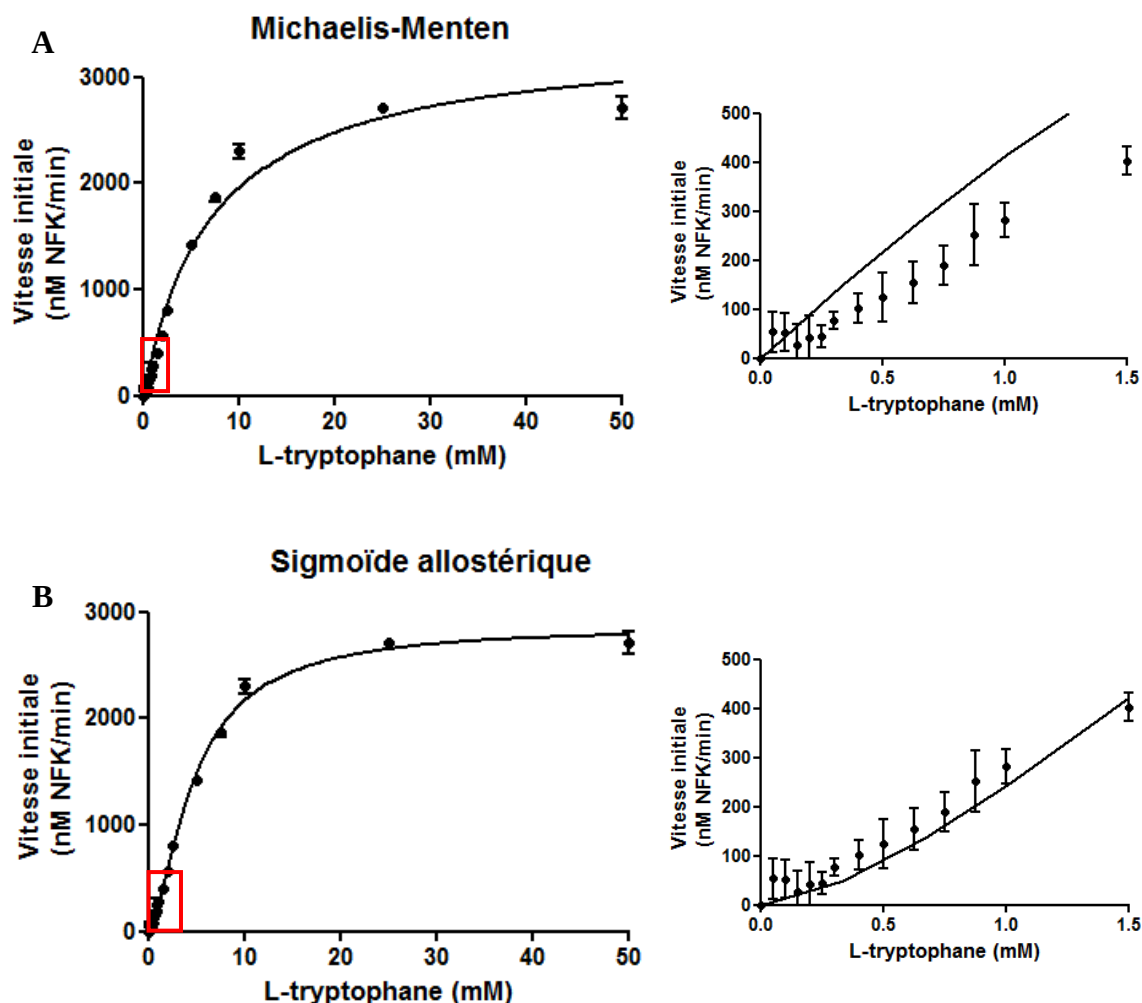


Figure 48 : Cinétique enzymatique de la protéine recombinante KynA.

La vitesse initiale de l'enzyme recombinante KynA a été suivie par spectrophotométrie à 321 nm (longueur d'onde d'émission du N-formyl-kynurénine, $\epsilon = 3750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en présence de concentration croissantes en L-tryptophane ($n=3$). Les courbes michaelienne (A ; $R^2=0,9754$) et allostérique (B ; $R^2=0,9936$) de la cinétique enzymatique ont été générées par le logiciel GraphPad Prism 5.

Lorsque la courbe générée suit un profil Michaélien (**Figure 48A**), le coefficient de corrélation est de 0,9754. Or, il est considéré qu'une équation de régression n'est fiable qu'à partir d'un coefficient de corrélation de 0,99. A faible concentration en L-tryptophane il est d'ailleurs visible que le profil Michaélien ne correspond pas aux résultats obtenus (**Figure 48A**). Une courbe allostérique a donc été générée (**Figure 48B**). Dans ce cas le coefficient de corrélation est de 0,9936. A nouveau, c'est à faible concentration en L-tryptophane principalement que nous pouvons observer un profil allostérique de l'enzyme (**Figure 48B**). La protéine KynA semble donc être une enzyme à comportement allostérique. Cela signifie que cette enzyme change de conformation sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une

molécule effectrice, changeant ainsi l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration en substrat.

Nous obtenons donc une vitesse maximum (V_{max}) de 2861 nM NFK / min et un K' de 10,81 mM de L-tryptophane. Le K catalytique (V_{max} divisé par la concentration en enzyme) est de 4,09 M NFK / min / M d'enzyme.

Plusieurs conclusions peuvent être déduites de ces résultats :

- La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est potentiellement régulée au niveau enzymatique
- L'enzyme KynA pourrait être multimérique

L'enzyme KynA est une tryptophane 2, 3 dioxygénase (TDO). Bien qu'un comportement allostérique n'ait jamais été démontré pour les homologues fonctionnels de KynA, la cristallographie des TDO de *Ralstonia metallidurans* et de *Xanthomonas campestris* (Yuasa et al., 2011; Zhang et al., 2007) montre que ces enzymes sont homotétramériques. De plus, Forouhar et son équipe ont mis en évidence la présence d'un site allostérique, où le tryptophane se fixerait à l'interface de trois des sous-unités du tétramère (Forouhar et al., 2007). Il serait donc raisonnable de penser que la TDO de *P. aeruginosa* pourrait également être un homotétramère à comportement allostérique lié au tryptophane.

3 La protéine recombinante KynA est multimérique

Afin d'étudier la structure quaternaire (multimérisation) de l'enzyme KynA de *P. aeruginosa*, la protéine a été analysée sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices et non-réductrices. De plus, l'influence du substrat sur sa conformation a été analysée en faisant migrer la protéine avec ou sans tryptophane (**Figure 49**).

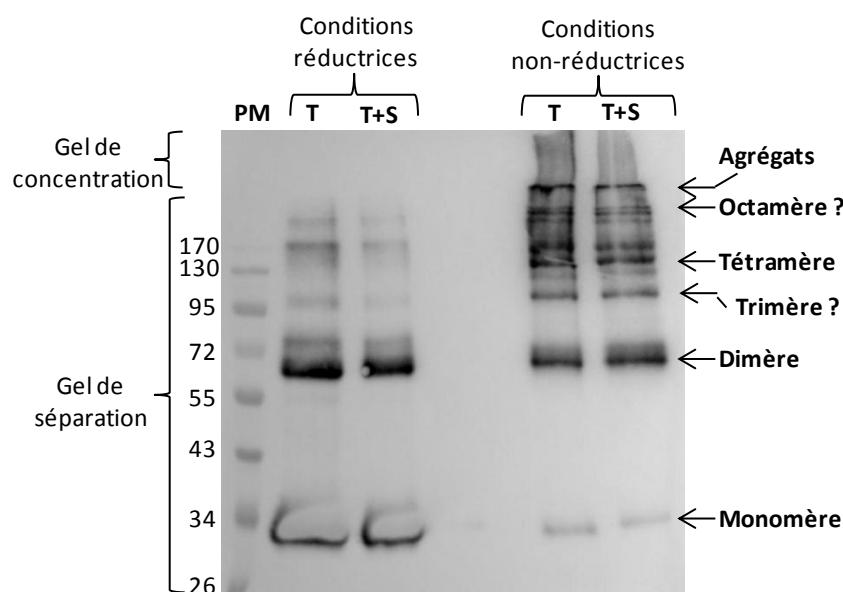


Figure 49 : Etude de la multimérisation de l'enzyme recombinante KynA.

L'enzyme recombinante purifiée KynA a été incubée dans du tampon phosphate pH 7,4 avec 10 mM de substrat (T+S) ou sans substrat (T). Après 2 h d'incubation à 25°C dans du bleu de dépôt contenant ou non du DTT (conditions réductrices ou non-réductrices respectivement), les échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE 8% et analysés par Western blot.

En conditions réductrices, la forme majoritaire obtenue est le monomère, grâce au DTT qui permet la réduction des ponts disulfures. Il y a également présence de dimères ainsi que d'autres formes de plus hauts poids moléculaires, mais en faibles quantités. La dénaturation et la réduction des protéines se fait par une incubation de 2 h à 25°C, les conditions de réduction ne sont donc pas optimales (**Figure 49**). La présence de tryptophane ne semble pas avoir d'effet sur la conformation de KynA.

En conditions non-réductrices, la présence de monomères est plus faible, ce qui confirme l'hypothèse que cette enzyme est multimérique. Deux formes semblent dominer : le dimère et le tétramère. Il y a également d'autres formes de la protéine, mais ne correspondant pas forcément à une forme "naturelle" de l'enzyme. En se référant au poids moléculaire, cela laisse penser qu'il s'agit de trimères (pour la forme de poids moléculaire comprise entre le dimère et le tétramère) et d'octamères (pour les formes de poids moléculaires supérieurs au tétramère). Il y a également présence de protéines agrégées. En effet, certaines protéines n'ont pas migrées du gel de concentration vers le gel de résolution, ce qui révèle la présence de molécules de très haut poids moléculaire. Egalement, des liaisons disulfures sont potentiellement impliquées étant donné que ce sont celles ciblées par le DTT (**Figure 49**).

Grâce à ces résultats, nous pouvons conclure que KynA est une protéine multimérique, et potentiellement tétramérique.

4 Le 1MT n'est pas un inhibiteur de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*

4.1 *Le L-1MT, mais pas le D-1MT, inhibe partiellement l'activité de l'enzyme recombinante KynA*

Les stéréoisomères du 1-méthyl-tryptophane (1MT), des homologues du substrat de la TDO et de l'IDO, ont précédemment été décrits comme des inhibiteurs de l'IDO humaine (Hou et al., 2007; Metz et al., 2007). De plus, ce sont les deux molécules les plus couramment testées comme inhibiteurs potentiels des TDO et IDO bactériennes ou humaines. Le pouvoir inhibiteur du D et le L-1MT sur la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* a donc été étudié. Dans un premier temps, ces deux inhibiteurs ont été testés en mesurant la vitesse initiale de l'enzyme recombinante KynA avec des concentrations croissantes en L-tryptophane et en présence de différentes doses en 1MT dans le milieu réactionnel (**Figure 50**).

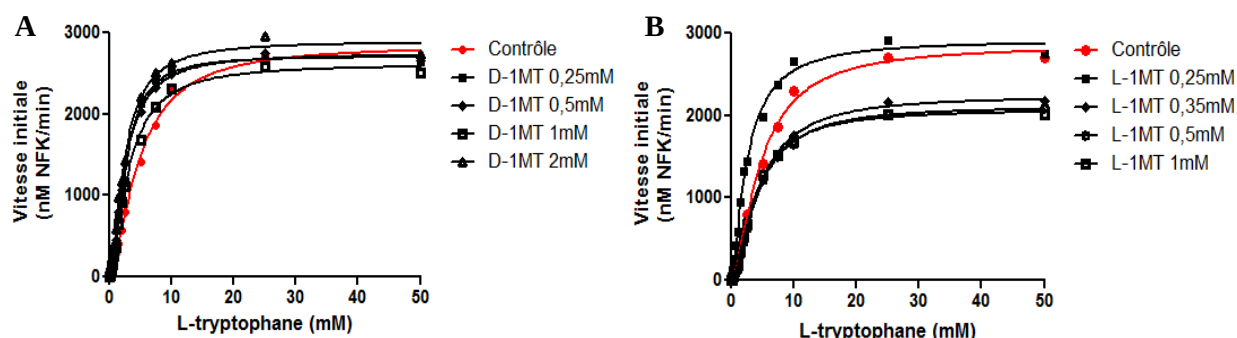


Figure 50 : Effet inhibiteur du D et L-1MT sur l'activité de l'enzyme KynA purifiée.

La vitesse initiale de l'enzyme recombinante KynA a été étudié par spectrophotométrie à 321 nm avec des concentrations croissantes en L-tryptophane en présence de différentes concentrations en D-1-méthyltryptophane (D-1MT ; A) ou en L-1-méthyltryptophane (L-1MT ; B), n=2.

Dans les conditions testées, le D-1MT ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'activité de l'enzyme KynA (**Figure 50A**). Le L-1MT, à partir de 0,35mM inhibe partiellement l'activité de l'enzyme recombinante KynA. En effet, une diminution de la V_{max} de 25% est observée de 0,35 à 1mM de L-1MT dans le milieu (**Figure 50B**). Cette molécule pourrait donc potentiellement être un inhibiteur de la voie des kynurénines chez *P. aeruginosa*.

4.2 Le L-1MT n'inhibe pas la production de kynurénine par *P. aeruginosa*

Suite aux résultats obtenus grâce à l'enzyme recombinante KynA, le L-1MT a été testé sur culture bactérienne comme inhibiteur potentiel de la voie des kynurénines. Pour cela, les bactéries ont été cultivées en milieu chimiquement défini contenant 1 mM de L-tryptophane, comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Des concentrations croissantes en L-1MT ont été ajoutées dans le milieu, puis la production de kynurénine a été mesurée par test colorimétrique via le réactif de Kovac (**Figure 51**).

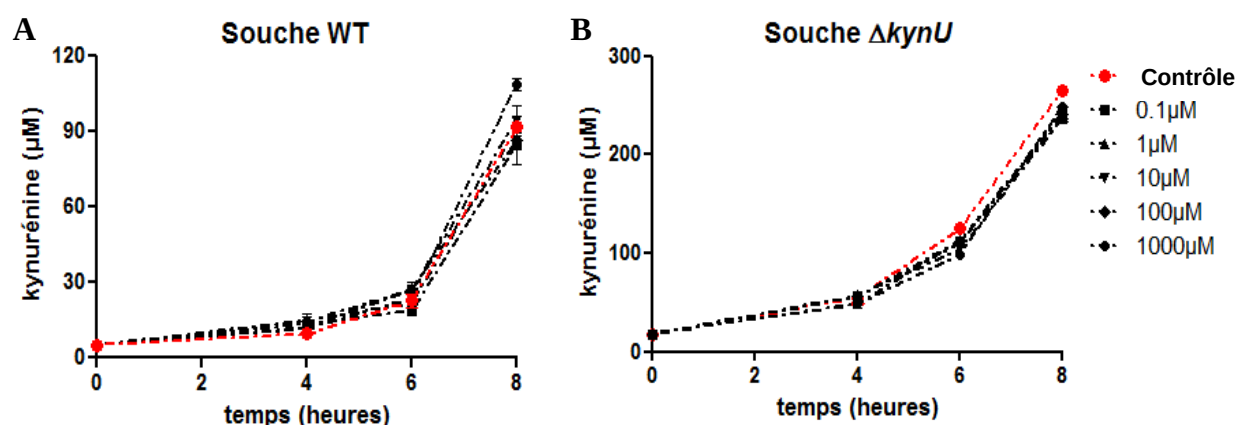


Figure 51 : Effet inhibiteur du L-1MT sur la production de kynurénine par *P. aeruginosa*.

Les bactéries WT (A) et $\Delta kynU$ (B) ont été mises en culture en milieu chimiquement défini, contenant 1 mM de L-tryptophane, avec différentes concentrations en L-1MT. A intervalle de temps régulier, un prélèvement a été effectué pour mesurer la concentration en kynurénine dans le surnageant par test colorimétrique avec du réactif de Kovac, n=3.

Lors du test sur la souche WT, aucun effet d'inhibition n'est observé (**Figure 51A**). Ce test a également été réalisé sur la souche $\Delta kynU$ (**Figure 51B**). Cette souche mutante a été utilisée afin d'exacerber l'effet de cet inhibiteur potentiel. En effet, cette souche bactérienne ne pouvant pas dégrader la kynurénine, et l'accumulant, l'effet d'un inhibiteur de la voie des kynurénines aurait été plus visible. Cependant, même dans ces conditions, aucun phénomène d'inhibition n'est observé. Dans les conditions testées, le L-1MT n'inhibe donc pas la production de kynurénine par les bactéries.

5 Discussion

Nous avons montré que la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* a un rôle dans la virulence de cette bactérie et donc représente une cible thérapeutique potentielle. C'est pourquoi la protéine KynA, la première enzyme de la voie des kynurénines, a été produite, purifiée et caractérisée. Une cinétique allostérique a été obtenue, suggérant une régulation au niveau enzymatique de la voie des kynurénines. Par exemple, il serait intéressant par la suite de tester des métabolites de la voie des kynurénines comme régulateurs potentiels de cette voie au niveau enzymatique, tels que la kynurénine, l'anthranilate, l'acide kynurénique, la 3-hydroxy-kynurénine, etc. Egalement, il a été montré dans la littérature que les formes réactives de l'oxygène peuvent avoir un rôle régulateur des enzymes de type TDO (Fu et al., 2011; Li et al., 2007). L'effet sur peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes sur l'activité de KynA devra être évalué et pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction hôte-pathogène.

Une comparaison des données enzymologiques des différentes TDO avec celles obtenues au laboratoire de *P. aeruginosa* a été réalisée (**Tableau 9**). Ceci révèle que ces homologues fonctionnels ont des propriétés assez variées.

Tableau 9 : Comparaison de la TDO de *P. aeruginosa* avec les homologues fonctionnels bactériens et humain.

Souche bactérienne	Identité de séquence	[TDO]	<i>K_m</i>	<i>K_{cat}</i>	<i>K_{cat}/K_m</i>	Référence bibliographique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		7.10^{-7}	10810	4,09	$3,86.10^{-4}$	Cette étude
<i>Ralstonia metallidurans</i>	66,89 %	1.10^{-5} à 2.10^{-5}	nr	nr	$1,83.10^{-3}$	Zhang et al., 2007
<i>Ralstonia metallidurans</i>	66,89 %	1.10^{-7}	350	1,36	$3,87.10^{-3}$	Kurnasov et al., 2003
<i>Erythrobacter litoralis</i>	47,22 %	2.10^{-7}	20600	5,1	$2,48.10^{-4}$	Yuasa et al., 2011
<i>Xanthomonas campestris</i>	41,83 %	nr	114	1,17	$1,03.10^{-2}$	Forouhar et al., 2007
<i>Streptomyces coelicolor</i>	36,76 %	$1,4$ à $2,8.10^{-6}$	120	0,114	$9,5.10^{-4}$	Zummo et al., 2012
Human	25,49 %	5.10^{-7}	120	134,4	1,12	Capece et al., 2011
<i>Streptomyces scabiei</i>	14,74 %	2.10^{-7}	41900	16,2	$3,87.10^{-4}$	Yuasa et al., 2011
<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	12,06 %	3.10^{-9}	73,3	543,3	7,41	Yuasa et al., 2011

Identité de séquences : obtenue par alignement de séquences sur le site uniprot.org (en pourcentage)

[TDO] : concentration en enzyme utilisée lors des tests (en mol/L)

K_m : concentration en substrat à laquelle on obtient la moitié de la *V_{max}* (en μ M de L-tryptophane)

K_{cat} : nombre de moles de produit formés par minute et par mole d'enzyme (en M NFK/min/M TDO)

K_{cat}/K_m : spécificité et efficacité catalytique de l'enzyme

Nr : non renseigné

Les trois TDO avec les identités de séquences les plus importantes, *R. metallidurans*, *E. litoralis* et *X. campestris*, ont également des propriétés enzymologiques proches (*K_{cat}* dans le même ordre de grandeur). Ces trois homologues sont donc les meilleurs modèles pour une modélisation bio-informatique de la TDO de *P. aeruginosa* par exemple. Les homologues fonctionnels de *S. scabiei* et de *G. aurantiaca*, en revanche, ont des identités de séquences inférieures à 15%, suggérant qu'ils ne représentent pas des modèles fiables. Ces disparités dans les séquences de ces enzymes nous ont incité à réaliser un arbre phylogénétique après alignement de séquences sur le site uniprot.org, en incluant également les IDO (indoléamine-2,3-dioxygénase) qui sont des homologues fonctionnels, mais pas structuraux, des TDO (Figure 52).

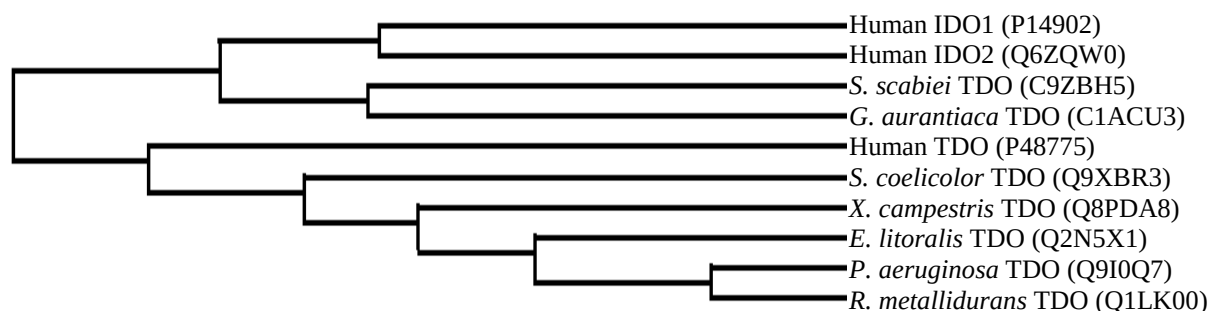


Figure 52 : Arbre phylogénétique des TDO et IDO bactériennes et humaines

Cet arbre phylogénétique a été généré suite à des alignements de séquences sur le site uniprot.org

Les homologues fonctionnels de *S. scabiei* et de *G. aurantiaca*, mentionnées précédemment, sont plus de type IDO que TDO. L'IDO a une spécificité de substrat plus large que la TDO. En effet, l'activité de la TDO est restreinte au L-tryptophane, alors que l'IDO est spécifique des indoles de façon générale. De plus, l'IDO est connue pour être une enzyme monomérique contrairement à la TDO qui est tétramérique (Batabyal and Yeh, 2007). Etant donné les résultats obtenus, pour la suite de l'étude comparative par alignement de séquences, seuls les TDO (bactériennes et humaine) sont étudiées (**Figure 53**).

Grâce à une étude bibliographique approfondie (Batabyal and Yeh, 2007; Capece et al., 2011; Dolusić et al., 2011; Forouhar et al., 2007; Zhang et al., 2007), les acides aminés impliqués dans la liaison et la stabilisation du tryptophane (carré bleu) et/ou de l'hème (rond violet) ont été identifiés (**Figure 53**). Quatre régions riches en acides aminés impliqués dans la liaison du tryptophane ou de l'hème se distinguent. Différentes couleurs ont été utilisées pour encadrer les acides aminés impliqués dans le site actif ou le site allostérique putatif pour représenter l'implication des différentes sous-unités du tétramère.

1	-----MCPCPHSQ-----AQG-----ETDGEAEWHNAALDFTHAMSYG DY LK LDKVL	42	<i>P. aeruginosa</i>
1	MSEFKGCPMGHGA-----APQNGDGGDSGDTGNGWHGAQMDFARDMSYGDYLG L DQIL	53	<i>R. metallidurans</i>
1	-----MAQDVTYSYLDLDRIL	17	<i>E. litoralis</i>
1	-----MPVDK-----NLRDLEPGIHTDLEGRITYG GYLRLDQLL	34	<i>X. campestris</i>
1	-----MSHDAFNLD FEGSTPYEDYVKADVL	26	<i>S. coelicolor</i>
1	---MSGCPFLGNNGFYTFKKLPVEGS-----EEDKSQTGVNRASKGGLIYGNYLHLEKVL	52	Human
43	DAQFPLSP-----DHNEMLFI IQHQTSELWMKIMLHELRAAREHVKSGKLG PALKMIA--	95	<i>P. aeruginosa</i>
54	SAQHPLSP-----DHNEMLFI VQHQTTELWMKIMLHELRAARDGVKSDQIQ PAFKMIA--	106	<i>R. metallidurans</i>
18	AAQHPVSG-----AHDEMLFI IVHQA SELWLKLC LHELFAARDCAADNLRPSFKMIS--	70	<i>E. litoralis</i>
35	SAQQPLSE---PAHHDEMLFI IQHQTSELWLKLLAHELRAAIVHLQRDEVWQCRKVIA--	89	<i>X. campestris</i>
27	HLQHTLSD-----DPGEMVFLVITQVMELWFTVI VHEWETAARALREDRTPVATDAIK--	79	<i>S. coelicolor</i>
53	NAQELQSETKGNKI HDEHLFI ITHQAYELWFKQILWELDSVREI FQNGHVRDERNMKVV	112	Human
96	----RVSRI FDQLVHAWAVLATMTPT EYNTIRPYLGQSSGFQSYQYREIEF ILGNKNATL	151	<i>P. aeruginosa</i>
107	----RVSRI MDQLVQAWNVLATMT PPEYSAMRPYLGASSGFQSYQYREIEF ILGNKNAAM	162	<i>R. metallidurans</i>
71	----RVARAQTQLIQSDVLSITMTPH DYSQIRPHLGRSSGFQSPQYRAMEFL LGGRNPDM	126	<i>E. litoralis</i>
90	----RSKQVLRQLTEQWSVLEITLPSEYMGFRDVLGPSSGFQSLQYRYIEF LLGNKNPQM	145	<i>X. campestris</i>
80	----RSQVREALNASWTPLAGLT PAQFN SYR SALLGEGSGFQSAMYRRLEFL LGDKSASM	135	<i>S. coelicolor</i>
113	SPMHRVSVILKLLVQCF SILETMTALDFNDFREYLS PASGFQSLQFRLL ENKIGVLQNM	172	Human
152	LKPHAH-----RAELLAALAEQAL-----HT	171	<i>P. aeruginosa</i>
163	LRPHAH-----RPEHLELVETAL-----HT	182	<i>R. metallidurans</i>
127	VAMHEP-----TPEIATLREEL-----AR	146	<i>E. litoralis</i>
146	LQVFAY-----DPAGQARLREVL-----EA	165	<i>X. campestris</i>
136	LVPHRG-----APRVHAELEKAL-----HE	155	<i>S. coelicolor</i>
173	-VPYNRRHYRDNFKGEENE L LKSEQEKT LLELVEAWLERT PGLEPHGFNFWGKLEKNIT	231	Human
172	PSLYDEAIRLMAAQGLPVSQERLAR-----DAAAGTCYEASVE	209	<i>P. aeruginosa</i>
183	PSMYDEAIRLMARRGFQIDPEVVER-----DWTQPTQYNASVE	220	<i>R. metallidurans</i>
147	TSLYDEAIRLLSRRGFAIPDEV LAR-----KLDEVVVRSEEEVE	184	<i>E. litoralis</i>
166	PSLYEEFLRYLARFGHAIPQQYQAR-----DWTAAHVADDTLR	203	<i>X. campestris</i>
156	PSLYDEVVRL LARRGYDIPDAVLQR-----DLTRKYEAAP EVE	193	<i>S. coelicolor</i>
232	RGLEEEFIRIQAKEESE EKEEQVAEFQKQKEVLLSLFDEKRHEHLLSKGERRLS YRALQG	291	Human
210	AAWRQVYQAPERYWDLYQLAEKLI DLEDSFRQWRFRHVTTV ERIIGFKRGTGGTEGVGYL	269	<i>P. aeruginosa</i>
221	AAWLEVYRNP SAHWELYELGEKFDLEDAFRQWRFRHVTTV ERVIGFKRGTGGTEGVSYL	280	<i>R. metallidurans</i>
185	AAWAEIYRDPQHQWDL YELAEKLV DLEYH FQWRFGHLKTVE RIIGFKRGTGGTKGVFYL	244	<i>E. litoralis</i>
204	PVFERIYENTDRYWREYSLCEILDVETQ FQLWRFRHMTVMFVIGFKRGTGGSSGVGF L	263	<i>X. campestris</i>
194	AAWTAVYSGD-QNGELARLGEALT DVAELVWRWRNDHLVATRFAMGSKTGTGGSSAGVAWL	252	<i>S. coelicolor</i>
292	ALMIYFYREEPRFQVFQ LITSLMDI DSLMTKWRYNHVCMMVHFM LGSKAGTGGSSGYHYL	351	Human
270	RSMLDT--ILFPELWRLRSNL-----	288	<i>P. aeruginosa</i>
281	RMMLDV--VLFP ELWLKLR TDL-----	299	<i>R. metallidurans</i>
245	EGVLKQ--AFFPELLSVRTAI-----	263	<i>E. litoralis</i>
264	QQALAL--TFFPELFDVRT SVGV DNRPPQGSADAGKR--	298	<i>X. campestris</i>
253	EKRARN--NVFPELWTARS YV-----	271	<i>S. coelicolor</i>
352	RSTVSDRYKVFDL FNLSTYLIPRH WIPKMNPTIHKFLYTA EYCDSSYFSSDESD	406	Human

Figure 53 : Alignement des TDO bactériennes et humaine.

Pour mettre en évidence des homologies de séquences entre les différentes TDO bactériennes et humaine, un alignement de séquence a été réalisé grâce au site uniprot.org.

* acides aminés conservés dans toutes les TDO ; : acides aminés similaires ; . acides aminés partiellement conservés

□ □ acides aminés impliqués dans le site actif principal

● acides aminés impliqués dans la liaison de l'hème ; ■ acides aminés impliqués dans la liaison du tryptophane

□ □ □ acides aminés impliqués dans le site allostérique putatif

Les acides aminés 54 à 67, 108 à 138 et 240 à 269 de la séquence de *P. aeruginosa* encadrés en bleu, sont les séquences formant la poche du site actif de l'enzyme, dans un monomère. Les acides aminés 32 à 36, encadrés en vert appartiennent à un second monomère et font partie d'une boucle permettant de fermer le site actif. Bien que ces acides aminés soient généralement conservés, on observe quelques exceptions :

- L'histidine 61 chez *P. aeruginosa* est remplacée par la thréonine chez *S. coelicolor*. Or, il est connu dans la littérature que des liaisons hydrogènes se forment entre le tryptophane et un groupement amine du cycle de l'histidine. Cela pourrait en partie expliquer la faible activité de cette TDO (K_{cat} 10 à 50 fois inférieur comparé aux autres TDO bactériennes) bien qu'il ne soit pas exclu que la thréonine puisse également avoir une liaison hydrogène avec le tryptophane.
- La tyrosine 119 chez *P. aeruginosa*, dont le groupement OH interagit avec le tryptophane, est remplacée par la phénylalanine chez l'Homme et *S. coelicolor*. Une étude a montré que la mutation de cette tyrosine en phénylalanine sur la TDO de *R. metallidurans* permet de multiplier par 15 l'activité de l'enzyme (Zhang et al., 2007). Cela pourrait expliquer en partie l'activité 25 à 100 fois plus importante de la TDO humaine comparée à la plupart des TDO bactérienne.
- La valine 250, qui semble assez conservée, même dans l'IDO humaine est remplacée par une thréonine chez *S. coelicolor*. A nouveau, cela pourrait expliquer en partie la faible activité de cette enzyme.

Dans tous les cas, aucune différence notable n'a été observée, entre les TDO de *P. aeruginosa*, *R. metallidurans*, *E. litoralis* et *X. campestris*, au niveau des acides aminés identifiés dans la littérature pour avoir un rôle clé dans l'activité de l'enzyme. Ceci semble confirmer que les études réalisées sur ces enzymes représentent une source d'information intéressante pour mieux comprendre la voie des kynurénines de la bactérie que nous étudions.

Un autre site de fixation du tryptophane, un site allostérique putatif, a été mis en évidence chez *X. campestris* (Forouhar et al., 2007). Celui-ci se trouve à l'interface entre trois sous-unités du tétramère. Les acides aminés impliqués des trois monomères sont symbolisés par trois couleurs différentes (jaune, orange et rouge).

Contrairement au site actif, les acides aminés sont beaucoup moins bien conservés parmi les TDO des différentes espèces étudiées. Seules la thréonine 115 et l'aspartate 234, de la séquence de *P. aeruginosa*, sont conservées parmi toutes les TDO. La similarité de séquences entre *P. aeruginosa* et *X. campestris* est plus importante, avec huit acides aminés

sur les douze identifiés par Forouhar et son équipe qui sont conservés. Cependant, une étude plus poussée de ce site allostérique putatif est nécessaire afin de confirmer les acides aminés impliqués.

Grâce aux alignements de séquences réalisés précédemment et à la collaboration avec le Dr Brice Hoffmann de l'équipe d'Analyse Multiéchelle des Macromolécules Biologiques de l'Institut de minéralogie et de physique des milieux condensés et de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, une structure bio-informatique de la protéine KynA a été réalisée. Etant donné les résultats d'alignement de séquences obtenus, la protéine a été modélisée sous forme tétramérique, en s'appuyant sur les structures des TDO de *X. campestris* et *R. metallidurans*, qui sont les deux TDO bactériennes qui ont été cristallisées. Cette modélisation a été réalisée grâce au logiciel VMD (Visual Molecular Dynamics). La **Figure 54** représente une vue d'ensemble de la protéine sous forme tétramérique.

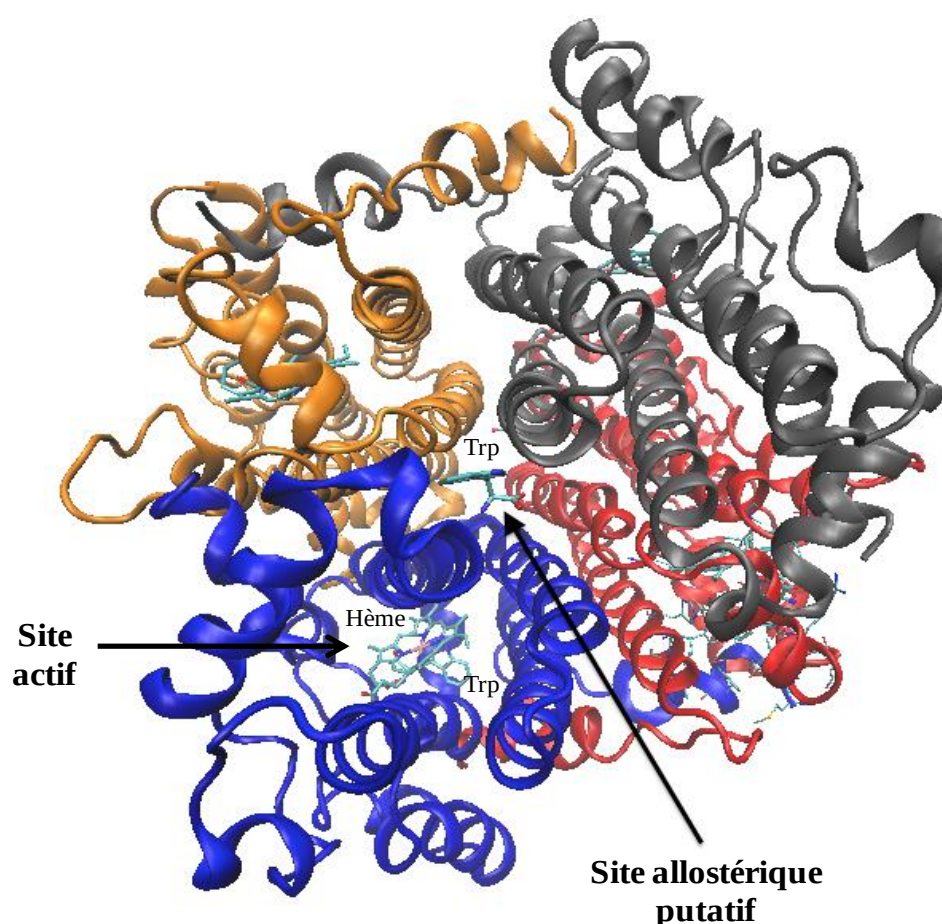


Figure 54 : Modélisation de la protéine KynA sous forme d'homotétramère

Modélisation de la protéine KynA réalisée grâce au logiciel VMD. Chaque monomère formant le tétramère est représenté sous une couleur différente (jaune, rouge, bleu et gris). Le site actif avec l'hème et le tryptophane, ainsi que le site allostérique putatif avec le tryptophane sont mis en évidence par une flèche.

Une couleur a été attribuée à chaque monomère formant l'homotétramère. Le site actif, à l'interface de deux monomères et le site allostérique putatif, à l'interface de trois monomères, sont mis en évidence par des flèches. Le site actif est à l'interface entre les monomères bleu (cœur du site actif) et rouge (boucle stabilisant le site actif). Le site allostérique putatif est à l'interface entre les monomères bleu, jaune et gris. Le monomère rouge est trop éloigné pour interagir directement avec le tryptophane.

La TDO a été décrite comme un "dimère de dimères" (Zhang et al., 2007). En effet, la formation d'un dimère est nécessaire pour l'obtention d'une cavité fonctionnelle permettant de lier le tryptophane (la cavité d'un monomère est partiellement formée par le monomère adjacent). La zone d'interaction liant ces deux monomères est plus étendue que celle liant les dimères entre eux. Ces interactions sont décrites comme des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des ponts salins. Les hélices α impliquées dans la formation du dimère sont mises en évidence dans la **Figure 55**.

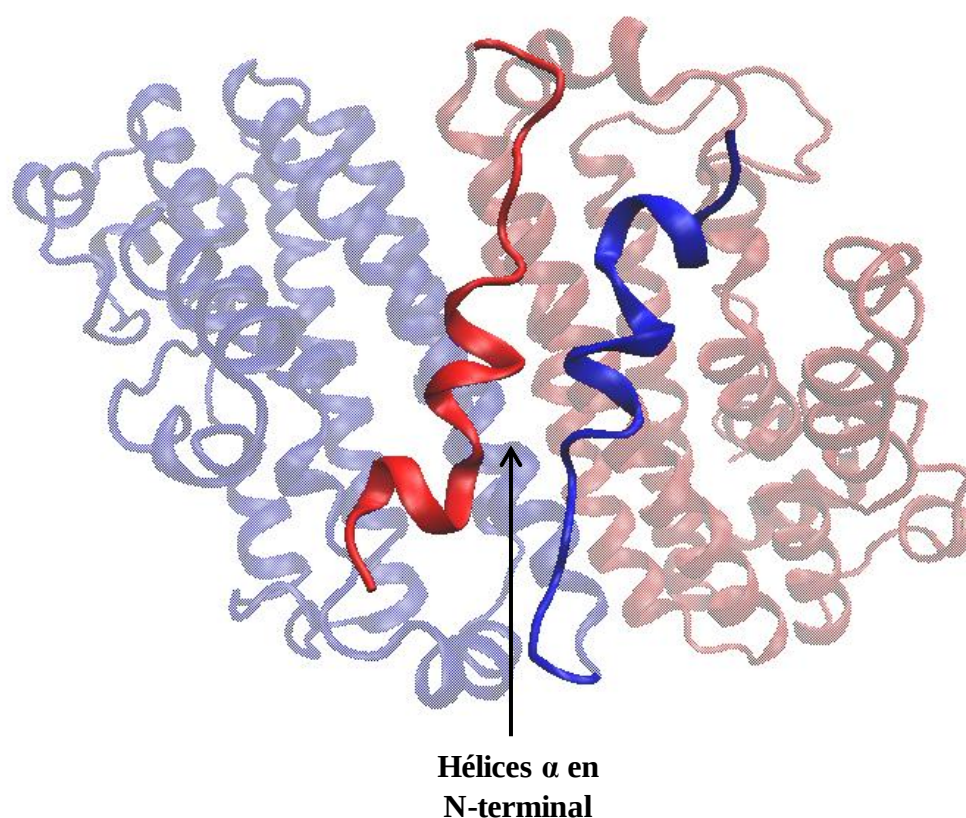


Figure 55 : Modélisation de la dimérisation de la protéine KynA

Modélisation de la protéine KynA réalisée grâce au logiciel VMD. Deux monomères (en rouge et bleu) permettant de former la première partie du "dimère de dimères". Les hélices α situées en N-terminal permettant la formation du premier dimère sont mises en évidence.

Deux monomères (ici en rouge et bleu) permettent de former la première partie du "dimère de dimères". L'hélice α située en N-terminal a été décrite dans la littérature comme étant celle permettant la formation du premier dimère, très stable. Les autres hélices α pourraient également participer à la stabilisation de ce dimère du fait de leur proximité.

Le site actif, principalement formé d'un monomère (ici en rouge), est fermé par une boucle appartenant à un autre monomère (ici en bleu) afin de stabiliser le site actif (**Figure 56**). Des acides aminés mis en évidence dans la **Figure 53** sont représentés ici.

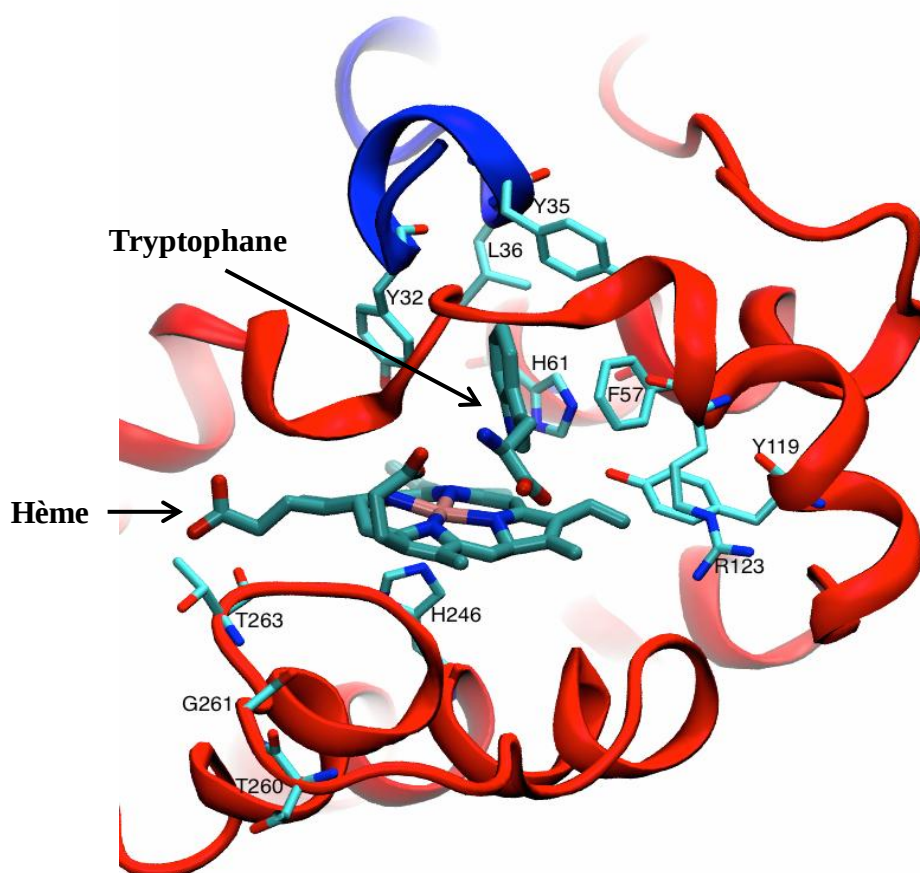


Figure 56 : Modélisation du site actif de KynA

Modélisation du site actif de la protéine KynA réalisée grâce au logiciel VMD. Les principaux acides aminés impliqués dans le site actif sont mis en évidence. Un premier monomère (rouge) forme le site actif et est stabilisé par un second monomère (bleu). Le tryptophane et l'hème du site actif sont mis en évidence par des flèches.

Sur le monomère représenté ici en rouge, les résidus H61, F57, Y119 et R123 sont décrits dans la littérature pour interagir directement avec le tryptophane. Le résidu H61 se lie également à l'hème. Le résidu H246 est impliqué dans la liaison de l'hème. La boucle contenant les résidus T260, G261 et T263 est représenté ici en conformation ouverte. En

conformation fermée, ces résidus interagissent avec l'hème et/ou le tryptophane (Zhang et al., 2007). Les résidus Y32, Y35 et L36 du monomère adjacent (représenté ici en bleu) permettent de stabiliser le site actif.

Le site allostérique putatif se situe à l'interface de trois monomères comme montré dans la vue d'ensemble. Les acides aminés mis en avant plus tôt dans la **Figure 53** ont également été représentés ici, afin de mieux visualiser le rôle de chacun d'eux dans ce site allostérique putatif (**Figure 57**).

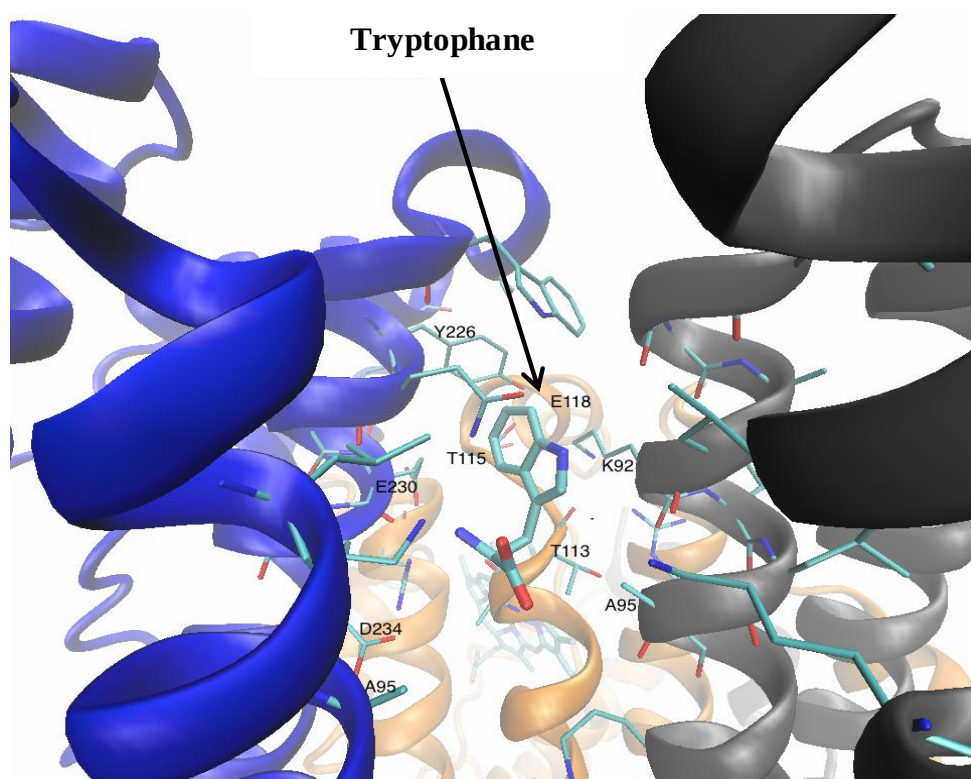


Figure 57 : Modélisation du site allostérique putatif de KynA

Modélisation du site allostérique putatif de la protéine KynA réalisée grâce au logiciel VMD. Les principaux acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison du tryptophane (désigné par une flèche) dans le site allostérique putatif sont mis en évidence. Ce site est à l'interface de trois monomères (jaune, bleu et gris).

Selon cette modélisation, les résidus Y226, E230 du monomère bleu, les résidus T115, T113 du monomère jaune et le résidu K92 du monomère noir, pourraient interagir avec le tryptophane dans le site allostérique putatif. Des expériences de mutagenèse dirigée seront à mener pour mieux appréhender le rôle de ce site de liaison du tryptophane dans l'activité de KynA.

Cette structure bio-informatique de KynA pourrait permettre de mieux cibler les expériences à réaliser par la suite sur cette enzyme, dans le but de mieux comprendre son fonctionnement et dans la recherche d'inhibiteurs spécifiques comme molécules thérapeutiques potentielles. Grâce à cette modélisation informatique de KynA, des acides aminés ont déjà pu être ciblés pour des expériences de mutagenèse dirigée et des études sur l'allostérie de l'enzyme sont en cours au laboratoire, réalisées par Sara El Kennani. Des résultats préliminaires ont été obtenus et semblent montrer que ce site allostérique putatif tient un rôle clé dans l'activité de l'enzyme. La mutation dans le site allostérique de la lysine 92 en alanine entraîne une forte perte d'activité de l'enzyme, avec un profil Michaelien. Ce site allostérique pourrait donc être une cible thérapeutique particulièrement intéressante. Cela permettrait d'inhiber la voie des kynurénines chez les bactéries sans risquer d'impacter l'activité essentielle de l'IDO (qui est un monomère et donc ne possède pas ce site allostérique) dans l'homéostasie du système immunitaire. Qui plus est, il a été montré récemment que la voie des kynurénines est déficiente dans un modèle murin de mucoviscidose (Iannitti et al., 2013), il est donc particulièrement important de ne pas inhiber cette voie de signalisation chez l'Homme.

CONCLUSION / PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que la kynurénine de *P. aeruginosa* permet à cette bactérie d'échapper à sa destruction par le système immunitaire inné et plus particulièrement les neutrophiles et les monocytes/macrophages. En effet en captant et éliminant les formes réactives de l'oxygène (FRO) produites par les phagocytes humains activés, la kynurénine produite par *P. aeruginosa* lors de l'interaction hôte/pathogène, favorise la survie des bactéries. De plus, la kynurénine semble permettre de stabiliser le phénotype immunosuppresseur des macrophages renforçant ainsi son rôle de contrôle du système immunitaire inné.

Afin de parfaire notre compréhension du rôle de la kynurénine bactérienne sur le contrôle du système immunitaire humain, des investigations sur les effets de la kynurénine sur les cellules présentatrices d'antigène (les cellules dendritiques et les macrophages) et sur la réponse immunitaire adaptative seront à mener. Plus particulièrement, il serait intéressant de mettre au contact les cellules présentatrices d'antigène avec des souches de *P. aeruginosa* produisant différents niveaux de kynurénine et par la suite mettre ces cellules au contact des lymphocytes T helper naïfs. L'étude de la différenciation et de la prolifération des lymphocytes permettrait de mieux comprendre l'impact de la kynurénine bactérienne sur la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

En outre, il a été montré que de nombreux pathogènes induisent l'activation de la voie des kynurénines de l'hôte (Schmidt and Schultze, 2014). Cependant, cela n'a jamais été montré dans le cas d'une infection par *P. aeruginosa*. L'effet de la kynurénine bactérienne sur l'activation de la voie des kynurénines de l'hôte sera aussi à explorer, car cela pourrait faire partie des mécanismes d'échappement au système immunitaire de ce pathogène, par l'induction de la tolérance immune. Par ailleurs, une étude a mis en avant un déficit de la voie des kynurénines dans un modèle murin de mucoviscidose (Iannitti et al., 2013). Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec une étude montrant un défaut de transport du tryptophane dans les cellules épithéliales des patients atteints de mucoviscidose (Zegarra-Moran et al., 2004). Le manque d'accessibilité du tryptophane par ces cellules, pourrait expliquer le défaut d'activité de la voie des kynurénines de l'hôte. Cependant, une étude réalisée sur des patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* montre un niveau comparable de kynurénine et de tryptophane dans le sérum comparé aux sujets sains (Sadowska-Bartosz et al., 2014). Le ratio kynurénine/tryptophane dans le sérum de chaque patient, révélateur de l'activité de la voie des kynurénines de l'hôte, n'a cependant pas été calculé. De ce fait, des études plus poussées sont donc nécessaires pour déterminer si la voie des kynurénines chez les patients atteints de mucoviscidose est réellement déficiente.

La kynurénine bactérienne, comme nous l'avons démontré, est un "scavenger" des FRO. Cela pourrait avoir un impact sur la régulation redox de l'immunité (Gostner et al., 2013). L'IDO, la première enzyme de la voie des kynurénines de l'hôte, est inhibée par le peroxyde d'hydrogène et, à l'inverse, les anions superoxydes ont un rôle de cofacteur et de substrat de cette enzyme à l'état purifié (Thomas and Stocker, 1999). En effet, la kynurénine, qui est un fort "scavenger" de l'H₂O₂ et dans une moindre mesure de l'O₂⁻, pourrait donc promouvoir l'activité de l'IDO, permettant ainsi l'induction de la tolérance immune par *P. aeruginosa*. A l'inverse, l'acide kynurénique, qui est un fort "scavenger" de l'O₂⁻ et à un moindre degré de l'H₂O₂, pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'activité de l'IDO.

Les FRO jouent également un rôle important dans la régulation de la mise en place de la réponse immunitaire. La voie NF-κB, qui tient un rôle majeur dans la phase précoce de l'infection, peut être induite par l'H₂O₂. Plusieurs modèles ont mis en avant, par exemple, que l'H₂O₂ favorise la fixation du complexe NF-κB à l'ADN dans la phase précoce de l'infection (Nakajima and Kitamura, 2013). Le "scavenging" du peroxyde d'hydrogène par la kynurénine bactérienne pourrait donc retarder ou inhiber l'activation de la voie NF-κB et ainsi perturber la mise en place de la réponse pro-inflammatoire de l'hôte.

La production de FRO est non seulement impliquée dans la phase précoce de l'infection mais elle tient également un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation. L'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes, l'efferocytose, permet d'induire la résolution de l'inflammation et un défaut de l'apoptose des neutrophiles peut donc engendrer un maintien de la réponse inflammatoire (Brüne et al., 2013; Ravichandran, 2010). Or il a été montré dans plusieurs modèles que la déficience de la production de FRO entraîne paradoxalement un défaut dans la résolution de l'inflammation, avec un maintien de la production de chimiokines et du recrutement des neutrophiles (Conway et al., 2012; Deng et al., 2012; Lopes et al., 2011; Whitmore et al., 2013). Ceci peut s'expliquer par le fait que les FRO, et plus particulièrement l'H₂O₂, sont impliqués dans les mécanismes d'apoptose des neutrophiles (Lopes et al., 2011; Yasui et al., 2005). En effet l'apoptose des neutrophiles est retardée en présence de "scavenger" des FRO (Scheel-Toellner et al., 2004). En outre, l'activation des macrophages en présence d'un inhibiteur des FRO entraîne une inhibition de la production d'IL-10 par ces cellules (Deng et al., 2012). Donc, paradoxalement, le "scavenging" des FRO par la kynurénine pourrait générer une déficience dans la résolution de l'inflammation.

Il existe également une régulation redox de la balance Th1/Th2. Des études ont montré que les antioxydants, comme le glutathion réduit ou encore les vitamines C et E induisent une

suppression de la réponse Th1, favorisant ainsi l'émergence d'une réponse Th2 (Gostner et al., 2013; Peterson et al., 1998; Zaknun et al., 2012). L'effet antioxydant de la kynurénine pourrait donc participer au déséquilibre de la balance Th1/Th2 observé chez les patients atteints de mucoviscidose (Hartl et al., 2006; Moser et al., 2005).

De façon plus générale, il serait intéressant d'étudier d'autres pathogènes possédant également la voie des kynurénines, pour savoir si elle représente une cible thérapeutique dans le cadre d'autres infections.

En outre, les découvertes réalisées lors de cette étude peuvent être appliquées à d'autres domaines, tels que la cancérologie et la neurologie par exemple. Il est connu que la voie des kynurénines fait partie des mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire (Johnson and Munn, 2012). Par ailleurs, certaines études mettent en avant que la forte capacité antioxydante des cellules cancéreuses représente un cible thérapeutique potentielle (Gorrini et al., 2013; Sosa et al., 2013). La kynurénine produite par les cellules cancéreuses, en plus du rôle dans l'induction d'un microenvironnement immunodéprimé, pourrait également être impliquée dans les mécanismes antioxydants. Ceci renforce donc l'intérêt thérapeutique de la voie des kynurénines.

La voie des kynurénines est également impliquée dans de nombreux désordres neurologiques, comme la schizophrénie, la dépression et les maladies neurodégénératives, comme Alzheimer, Parkinson ou encore Huntington (Kincses et al., 2010; Möller, 2010; Müller et al., 2011; Plangar et al., 2012; Sublette and Postolache, 2012; Zádori et al., 2012). Plusieurs métabolites ont été identifiés pour leurs effets neurotoxiques (la 3-hydroxy-kynurénine et l'acide quinolinique) ou neuroprotecteurs (l'acide kynurénique), mais la kynurénine n'a été que peu étudiée dans ce cadre. Parallèlement, le stress oxydant a été largement impliqué dans de nombreux désordres neurologiques (Gandhi and Abramov, 2012; Michel et al., 2012). Ainsi il est possible que la kynurénine, par son effet antioxydant, puisse avoir un effet neuroprotecteur comme l'acide kynurénique. Cependant ceci reste à être démontré.

En conclusion, la voie des kynurénines est impliquée dans de nombreux phénomènes inflammatoires. Une meilleure connaissance de cette voie et de l'effet des différents métabolites pourrait donc permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie de nombreuses maladies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007a). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942–949.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007b). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639–646.
- Aguilar-Guisado, M., Givald , J., Ussetti, P., Ramos, A., Morales, P., Blanes, M., Bou, G., de la Torre-Cisneros, J., Román, A., Borro, J.M., et al. (2007). Pneumonia after lung transplantation in the RESITRA Cohort: a multicenter prospective study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1989–1996.
- Ahmad, I., Balasubramanian, S., Del Debbio, C.B., Parameswaran, S., Katz, A.R., Toris, C., and Fariss, R.N. (2011). Regulation of ocular angiogenesis by Notch signaling: implications in neovascular age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 2868–2878.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P. ., Phipps, R.K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L.D., van Gennip, M., Parsek, M., H iby, N., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 3500–3508.
- Alhede, M., Kragh, K.N., Qvortrup, K., Allesen-Holm, M., van Gennip, M., Christensen, L.D., Jensen, P. ., Nielsen, A.K., Parsek, M., Wozniak, D., et al. (2011). Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PloS One* 6, e27943.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., and Alhede, M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv. Appl. Microbiol.* 86, 1–40.
- Allen, R.C., and Stephens, J.T., Jr (2011). Myeloperoxidase selectively binds and selectively kills microbes. *Infect. Immun.* 79, 474–485.
- Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G., and Whyte, M.K.B. (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 3643–3649.
- Amano, H., Morimoto, K., Senba, M., Wang, H., Ishida, Y., Kumatori, A., Yoshimine, H., Oishi, K., Mukaida, N., and Nagatake, T. (2004). Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 398–409.
- Amiel, E., Lovewell, R.R., O’Toole, G.A., Hogan, D.A., and Berwin, B. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect. Immun.* 78, 2937–2945.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489.

Anathy, V., Aesif, S.W., Hoffman, S.M., Bement, J.L., Guala, A.S., Lahue, K.G., Leclair, L.W., Suratt, B.T., Cool, C.D., Wargo, M.J., et al. (2014). Glutaredoxin-1 attenuates S-glutathionylation of the death receptor fas and decreases resolution of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 463–474.

Anderson, C.F., and Mosser, D.M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 72, 101–106.

Apidianakis, Y., and Rahme, L.G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat. Protoc.* 4, 1285–1294.

Armstrong, D.K., Cunningham, S., Davies, J.C., and Alton, E.W.F.W. (2014). Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 99, 465–468.

Ayyadurai, N., Ravindra Naik, P., Sreehari Rao, M., Sunish Kumar, R., Samrat, S.K., Manohar, M., and Sakthivel, N. (2006). Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *J. Appl. Microbiol.* 100, 926–937.

Azghani, A.O., Miller, E.J., and Peterson, B.T. (2000). Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 178, 261–269.

B

Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 2475–2483.

Babcock, T.A., and Carlin, J.M. (2000). Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12, 588–594.

Baco, E., Hoegy, F., Schalk, I.J., and Mislin, G.L.A. (2014). Diphenyl-benzo[1,3]dioxole-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester: a convenient catechol precursor in the synthesis of siderophore vectors suitable for antibiotic Trojan horse strategies. *Org. Biomol. Chem.* 12, 749–757.

Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J.M., Madoulet, C., Plotkowski, M.C., Chippaux, C., and Puchelle, E. (1994). Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* 62, 4481–4487.

Balasundram, N., Ai, T.Y., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., and Samman, S. (2005). Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 14, 319–324.

Baldwin, M.R., and Barbieri, J.T. (2005). The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291, 147–166.

Ballok, A.E., and O'Toole, G.A. (2013). Pouring salt on a wound: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors alter Na⁺ and Cl⁻ flux in the lung. *J. Bacteriol.* 195, 4013–4019.

-
- Bardoel, B.W., Hartsink, D., Vughs, M.M., de Haas, C.J.C., van Strijp, J.A.G., and van Kessel, K.P.M. (2012). Identification of an immunomodulating metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa* (IMPa). *Cell. Microbiol.* 14, 902–913.
- Barth, A.L., and Pitt, T.L. (1996). The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 45, 110–119.
- Batabyal, D., and Yeh, S.-R. (2007). Human tryptophan dioxygenase: a comparison to indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 15690–15701.
- Beaudoin, T., LaFayette, S., Roussel, L., Bérubé, J., Desrosiers, M., Nguyen, D., and Rousseau, S. (2013). The level of p38 α mitogen-activated protein kinase activation in airway epithelial cells determines the onset of innate immune responses to planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 207, 1544–1555.
- Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *BioTechniques* 29, 948–950, 952.
- Belladonna, M.L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M.T., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2008). Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5194–5198.
- Belladonna, M.L., Orabona, C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2009). TGF-beta and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends Mol. Med.* 15, 41–49.
- Benmohamed, F., Medina, M., Wu, Y.-Z., Maschalidi, S., Jouvion, G., Guillemot, L., Chignard, M., Manoury, B., and Touqui, L. (2014). Toll-like receptor 9 deficiency protects mice against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *PloS One* 9, e90466.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3733–3739.
- Van den Berg, J.M., van Koppen, E., Ahlin, A., Belohradsky, B.H., Bernatowska, E., Corbeel, L., Español, T., Fischer, A., Kurenko-Deptuch, M., Mouy, R., et al. (2009). Chronic granulomatous disease: the European experience. *PloS One* 4, e5234.
- Bernard, H., Desseyn, J.-L., Bartke, N., Kleinjans, L., Stahl, B., Belzer, C., Knol, J., Gottrand, F., and Husson, M.-O. (2014). Dietary Pectin-Derived Acidic Oligosaccharides Improve the Pulmonary Bacterial Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection in Mice by Modulating Intestinal Microbiota and Immunity. *J. Infect. Dis.*
- Bérubé, J., Roussel, L., Nattagh, L., and Rousseau, S. (2010). Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 285, 22299–22307.
- Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S., Mazza, E.M.C., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 511, 184–190.
-

- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- Bhavsar, T., Liu, M., Hardej, D., Liu, X., and Cantor, J. (2010). Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in hamsters. *Exp. Lung Res.* 36, 94–100.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114, 2619–2622.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M., and Høiby, N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 44, 547–558.
- Boasso, A., Herbeuval, J.-P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., and Shearer, G.M. (2007). HIV inhibits CD4⁺ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109, 3351–3359.
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5, 279–313.
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 267, 23301–23308.
- Boles, B.R., and Singh, P.K. (2008). Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12503–12508.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57, 1210–1223.
- Bomberger, J.M., Ye, S., Maceachran, D.P., Koeppen, K., Barnaby, R.L., O’Toole, G.A., and Stanton, B.A. (2011). A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathog.* 7, e1001325.
- Bomberger, J.M., Ely, K.H., Bangia, N., Ye, S., Green, K.A., Green, W.R., Enelow, R.I., and Stanton, B.A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Cif protein enhances the ubiquitination and proteasomal degradation of the transporter associated with antigen processing (TAP) and reduces major histocompatibility complex (MHC) class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 289, 152–162.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D’Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187, 129–134.

- Boontham, P., Robins, A., Chandran, P., Pritchard, D., Cámara, M., Williams, P., Chuthapisith, S., McKechnie, A., Rowlands, B.J., and Eremin, O. (2008). Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 115, 343–351.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657–670.
- Botha, P., Archer, L., Anderson, R.L., Lordan, J., Dark, J.H., Corris, P.A., Gould, K., and Fisher, A.J. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 85, 771–774.
- Boyanova, M., Tsanev, R., and Ivanov, I. (2002). A modified kynurenine bioassay for quantitative determination of human interferon-gamma. *Anal. Biochem.* 308, 178–181.
- Boyle, M.P., Bell, S.C., Konstan, M.W., McColley, S.A., Rowe, S.M., Rietschel, E., Huang, X., Waltz, D., Patel, N.R., and Rodman, D. (2014). A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* 2, 527–538.
- Böyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 97, 7.
- Bozza, S., Fallarino, F., Pitzurra, L., Zelante, T., Montagnoli, C., Bellocchio, S., Mosci, P., Vacca, C., Puccetti, P., and Romani, L. (2005). A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 2910–2918.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J., Di Serio, C., Döring, G., and Tümmler, B. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 138–145.
- Branski, L.K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M.G., Sanford, A.P., and Herndon, D.N. (2009). Emerging infections in burns. *Surg. Infect.* 10, 389–397.
- Braun, D., Longman, R.S., and Albert, M.L. (2005). A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106, 2375–2381.
- Brazova, J., Sediva, A., Pospisilova, D., Vavrova, V., Pohunek, P., Macek, M., Bartunkova, J., and Lausmann, H. (2005). Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 115, 210–215.
- Bréchar, S., Plançon, S., and Tschirhart, E.J. (2013). New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca(2+) signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 661–676.

Brennan, S., Sly, P.D., Gangell, C.L., Sturges, N., Winfield, K., Wikstrom, M., Gard, S., Upham, J.W., and AREST CF (2009). Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 34, 655–661.

Briel, M., Greger, R., and Kunzelmann, K. (1998). Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J. Physiol.* 508 (Pt 3), 825–836.

Brinkman, A.B., Ettema, T.J.G., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* 48, 287–294.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Britigan, B.E., Hayek, M.B., Doebeeling, B.N., and Fick, R.B. (1993). Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 61, 5049–5055.

Brubaker, R.R. (2003). Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersiniae*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* 71, 3673–3681.

Brüne, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., von Knethen, A., and Weigert, A. (2013). Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 595–637.

Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., and Nizet, V. (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol. CB* 16, 396–400.

Burguete, S.R., Maselli, D.J., Fernandez, J.F., and Levine, S.M. (2013). Lung transplant infection. *Respirol. Carlton Vic* 18, 22–38.

Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S., and Gilroy, D.W. (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112, 4117–4127.

C

Caldwell, C.C., Chen, Y., Goetzmann, H.S., Hao, Y., Borchers, M.T., Hassett, D.J., Young, L.R., Mavrodi, D., Thomashow, L., and Lau, G.W. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 175, 2473–2488.

Calfee, M.W., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11633–11637.

-
- Campos, S., Caramori, M., Teixeira, R., Afonso, J., Carraro, R., Strabelli, T., Samano, M., Pêgo-Fernandes, P., and Jatene, F. (2008). Bacterial and fungal pneumonias after lung transplantation. *Transplant. Proc.* 40, 822–824.
- Capece, L., Lewis-Ballester, A., Marti, M.A., Estrin, D.A., and Yeh, S.-R. (2011). Molecular basis for the substrate stereoselectivity in tryptophan dioxygenase. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 10910–10918.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M., and Sack, J.L. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am. Fam. Physician* 63, 2413–2420.
- Carmody, L.A., Zhao, J., Schloss, P.D., Petrosino, J.F., Murray, S., Young, V.B., Li, J.Z., and LiPuma, J.J. (2013). Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 10, 179–187.
- Carrichon, L., Picciocchi, A., Debeurme, F., Defendi, F., Beaumel, S., Jesaitis, A.J., Dagher, M.-C., and Stasia, M.-J. (2011). Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 78–90.
- Carrigan, S.O., Yang, Y.J., Issekutz, T., Forward, N., Hoskin, D., Johnston, B., and Lin, T.-J. (2009). Depletion of natural CD4+CD25+ T regulatory cells with anti-CD25 antibody does not change the course of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection in mice. *Immunobiology* 214, 211–222.
- Cassatella, M.A., Guasparri, I., Ceska, M., Bazzoni, F., and Rossi, F. (1993). Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 78, 177–184.
- Chaker, H. (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane (Grenoble).
- Chaves, A.C., Cerávol, I.P., Gomes, J.A., Zani, C.L., Romanha, A.J., and Gazzinelli, R.T. (2001). IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 31, 333–344.
- Cheluvappa, R., Shimmon, R., Dawson, M., Hilmer, S.N., and Le Couteur, D.G. (2008). Reactions of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin with reduced glutathione. *Acta Biochim. Pol.* 55, 571–580.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., and McLeish, K.R. (2003). Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md* 170, 5302–5308.
- Cheng, D., Han, W., Chen, S.M., Sherrill, T.P., Chont, M., Park, G.-Y., Sheller, J.R., Polosukhin, V.V., Christman, J.W., Yull, F.E., et al. (2007). Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 178, 6504–6513.
- Cheung, D.O., Halsey, K., and Speert, D.P. (2000). Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 68, 4585–4592.
-

-
- Chhabra, S.R., Harty, C., Hooi, D.S.W., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D.I., and Bycroft, B.W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J. Med. Chem.* 46, 97–104.
- Chizzolini, C., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D., and Dayer, J.M. (2000). Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 5952–5960.
- Choi, K.-H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* 64, 391–397.
- Chugani, S., and Greenberg, E.P. (2010). LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10673–10678.
- Cifani, N., Pompili, B., Anile, M., Patella, M., Diso, D., Venuta, F., Cimino, G., Quattrucci, S., Di Domenico, E.G., Ascenzioni, F., et al. (2013). Reactive-oxygen-species-mediated *P. aeruginosa* killing is functional in human cystic fibrosis macrophages. *PloS One* 8, e71717.
- Cigana, C., Curcurù, L., Leone, M.R., Ieranò, T., Lorè, N.I., Bianconi, I., Silipo, A., Cozzolino, F., Lanzetta, R., Molinaro, A., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PloS One* 4, e8439.
- Cigana, C., Lorè, N.I., Bernardini, M.L., and Bragonzi, A. (2011). Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 852513.
- Coffman, R.L., Seymour, B.W., Hudak, S., Jackson, J., and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308–310.
- Cohen, T.S., and Prince, A. (2012). Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* 18, 509–519.
- Cohen, T.S., and Prince, A.S. (2013). Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J. Clin. Invest.* 123, 1630–1637.
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., and Hendrickson, A.M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8, 197–199.
- Cole, A.M., Thapa, D.R., Gabayan, V., Liao, H.-I., Liu, L., and Ganz, T. (2005). Decreased clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from airways of mice deficient in lysozyme M. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1081–1085.
-

Collier, D.N., Anderson, L., McKnight, S.L., Noah, T.L., Knowles, M., Boucher, R., Schwab, U., Gilligan, P., and Pesci, E.C. (2002). A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 41–46.

Collins, F.S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774–779.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.

Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* 14, 1913–1928.

Conese, M., Copreni, E., Di Gioia, S., De Rinaldis, P., and Fumarulo, R. (2003). Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 2, 129–135.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759–769.

Conway, K.L., Goel, G., Sokol, H., Manocha, M., Mizoguchi, E., Terhorst, C., Bhan, A.K., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2012). p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 3631–3640.

Cox, J.A., Jeng, A.Y., Sharkey, N.A., Blumberg, P.M., and Tauber, A.I. (1985). Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J. Clin. Invest.* 76, 1932–1938.

Cribbs, A.P., Kennedy, A., Penn, H., Read, J.E., Amjadi, P., Green, P., Syed, K., Manka, S.W., Brennan, F.M., Gregory, B., et al. (2014). Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 66, 2344–2354.

Curti, A., Trabanelli, S., Salvestrini, V., Baccarani, M., and Lemoli, R.M. (2009). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113, 2394–2401.

D

Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 67, 6164–6167.

Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 68, 2916–2924.

-
- Dahlgren, C., and Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* 232, 3–14.
- Dai, X., and Zhu, B.T. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 58, 17–28.
- D’Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Cutting Edge: Selective Up-Regulation of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 upon Activation of Polarized Human Type 2 Th Cells. *J. Immunol.* 161, 5111–5115.
- Darling, K.E.A., and Evans, T.J. (2003). Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 71, 2341–2349.
- Davidson, A.G.F., Chilvers, M.A., and Lillquist, Y.P. (2012). Effects of a *Pseudomonas aeruginosa* eradication policy in a cystic fibrosis clinic. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 18, 615–621.
- Decoursey, T.E., and Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 2173–2193.
- Decraene, A., Willems-Widyastuti, A., Kasran, A., De Boeck, K., Bullens, D.M., and Dupont, L.J. (2010). Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respir. Res.* 11, 177.
- Deng, J., Wang, X., Qian, F., Vogel, S., Xiao, L., Ranjan, R., Park, H., Karpurapu, M., Ye, R.D., Park, G.Y., et al. (2012). Protective role of reactive oxygen species in endotoxin-induced lung inflammation through modulation of IL-10 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 5734–5740.
- Denning, G.M., Iyer, S.S., Reszka, K.J., O’Malley, Y., Rasmussen, G.T., and Britigan, B.E. (2003). Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L584–L592.
- Deriy, L.V., Gomez, E.A., Zhang, G., Beacham, D.W., Hopson, J.A., Gallan, A.J., Shevchenko, P.D., Bindokas, V.P., and Nelson, D.J. (2009). Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 284, 35926–35938.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1339–1344.
- Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A.P., Bindokas, V., et al. (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 8, 933–944.
-

Dick, R., Murray, B.P., Reid, M.J., and Correia, M.A. (2001). Structure--function relationships of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase: identification of the putative heme-ligating histidine residues. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 71–78.

DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J., and Perdew, G.H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 115, 89–97.

Dolusić, E., Larrieu, P., Moineaux, L., Stroobant, V., Pilotte, L., Colau, D., Pochet, L., Van den Eynde, B., Masereel, B., Wouters, J., et al. (2011). Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. *J. Med. Chem.* 54, 5320–5334.

Dorfman, R., Sandford, A., Taylor, C., Huang, B., Frangolias, D., Wang, Y., Sang, R., Pereira, L., Sun, L., Berthiaume, Y., et al. (2008). Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 118, 1040–1049.

Döring, G., Meisner, C., Stern, M., and Flagella Vaccine Trial Study Group (2007). A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11020–11025.

Douda, D.N., Jackson, R., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2011). Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 1856–1865.

Dubin, P.J., Martz, A., Eisenstatt, J.R., Fox, M.D., Logar, A., and Kolls, J.K. (2012). Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 80, 398–409.

Dulon, S., Leduc, D., Cottrell, G.S., D'Alayer, J., Hansen, K.K., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D., Pidard, D., and Chignard, M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 411–419.

Dustin, M.L. (2014). What counts in the immunological synapse? *Mol. Cell* 54, 255–262.

E

Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., and Mosser, D.M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1298–1307.

Eftekhari, F., and Speert, D.P. (1988). Alginase treatment of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* enhances phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 56, 2788–2793.

El-Benna, J., Dang, P.M.-C., and Gougerot-Pocidalo, M.-A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.* 30, 279–289.

El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Gougerot-Pocidalo, M.A., Marie, J.C., and Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* 41, 217–225.

El-Benna, J., Dang, P.M.-C., and Périanin, A. (2012). Towards specific NADPH oxidase inhibition by small synthetic peptides. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 2307–2314.

Elborn, J.S., Hodson, M., and Bertram, C. (2009). Implementation of European standards of care for cystic fibrosis--control and treatment of infection. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 211–217.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286.

Enderle, P.J., and Farwell, M.A. (1998). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *BioTechniques* 25, 954–956, 958.

Engel, J., and Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 61–66.

Engel, L.S., Hill, J.M., Caballero, A.R., Green, L.C., and O’Callaghan, R.J. (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273, 16792–16797.

Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., and Takahashi, M. (2005). Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell* 9, 389–402.

Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., et al. (2006). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 656–661.

Epelman, S., Stack, D., Bell, C., Wong, E., Neely, G.G., Krutzik, S., Miyake, K., Kubes, P., Zbytnuik, L.D., Ma, L.L., et al. (2004). Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 2031–2040.

F

Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., and Henson, P.M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 149, 4029–4035.

Fajac, I., and Sermet-Gaudelus, I. (2013). [Cystic fibrosis: new treatments targeting the CFTR protein]. *Rev. Mal. Respir.* 30, 255–261.

Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9, 1069–1077.

- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 6752–6761.
- Fang, F.C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99, 2818–2825.
- Farrow, J.M., 3rd, and Pesci, E.C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J. Bacteriol.* 189, 3425–3433.
- Faure, E., Mear, J.-B., Faure, K., Normand, S., Couturier-Maillard, A., Grandjean, T., Balloy, V., Ryffel, B., Dessein, R., Chignard, M., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 799–811.
- Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., et al. (2010). Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci. Transl. Med.* 2, 32ra36.
- Fodor, A.A., Klem, E.R., Gilpin, D.F., Elborn, J.S., Boucher, R.C., Tunney, M.M., and Wolfgang, M.C. (2012). The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PloS One* 7, e45001.
- Forouhar, F., Anderson, J.L.R., Mowat, C.G., Vorobiev, S.M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S.J., Seetharaman, J., Tucker, T., et al. (2007). Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 473–478.
- Fournier, D., Garnier, P., Jeannot, K., Mille, A., Gomez, A.-S., and Plésiat, P. (2013). A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3846–3848.
- Fox, J.M., Sage, L.K., Huang, L., Barber, J., Klonowski, K.D., Mellor, A.L., Tompkins, S.M., and Tripp, R.A. (2013). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* 94, 1451–1461.
- Fox, J.M., Sage, L.K., Poore, S., Johnson, S., Tompkins, S.M., and Tripp, R.A. (2014). Drug analog inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity modifies pattern recognition receptor expression and proinflammatory cytokine responses early during influenza virus infection. *J. Leukoc. Biol.*
- François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., and Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 187–195.
- Freewan, M., Rees, M.D., Plaza, T.S.S., Glaros, E., Lim, Y.J., Wang, X.S., Yeung, A.W.S., Witting, P.K., Terentis, A.C., and Thomas, S.R. (2013). Human indoleamine 2,3-dioxygenase is a catalyst of physiological heme peroxidase reactions: implications for the inhibition of dioxygenase activity by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 288, 1548–1567.

Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459–468.

Fu, R., Gupta, R., Geng, J., Dornevil, K., Wang, S., Zhang, Y., Hendrich, M.P., and Liu, A. (2011). Enzyme reactivation by hydrogen peroxide in heme-based tryptophan dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 286, 26541–26554.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241.

Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., and Seishima, M. (2006). The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 655–662.

Fujigaki, H., Seishima, M., and Saito, K. (2012). Posttranslational modification of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1777–1782.

G

Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1035–1044.

Gandhi, S., and Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 428010.

Ganz, T. (2004). Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biol.* 327, 539–549.

Le Gars, M., Descamps, D., Roussel, D., Saussereau, E., Guillot, L., Ruffin, M., Tabary, O., Hong, S.-S., Boulanger, P., Paulais, M., et al. (2013). Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 170–179.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.

Genestet, C., Le Gouellec, A., Chaker, H., Polack, B., Guery, B., Toussaint, B., and Stasia, M.J. (2014). Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radic. Biol. Med.* 73C, 400–410.

Gilbert, K.B., Kim, T.H., Gupta, R., Greenberg, E.P., and Schuster, M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol. Microbiol.* 73, 1072–1085.

Goffard, A., Lambert, V., Salleron, J., Herwegh, S., Engelmann, I., Pinel, C., Pin, I., Perrez, T., Prévotat, A., Dewilde, A., et al. (2014). Virus and cystic fibrosis: rhinoviruses are

associated with exacerbations in adult patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 60, 147–153.

González, A., Varo, N., Alegre, E., Díaz, A., and Melero, I. (2008). Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiologic approach. *Adv. Clin. Chem.* 45, 155–197.

Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947.

Gostner, J.M., Becker, K., Fuchs, D., and Sucher, R. (2013). Redox regulation of the immune response. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 18, 88–94.

Grasemann, H., Schwiertz, R., Matthiesen, S., Racké, K., and Ratjen, F. (2005). Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1523–1528.

Grassmé, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kürthy, G., Lang, F., Weller, M., and Gulbins, E. (2000). CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 290, 527–530.

Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C.E., Schledzewski, K., and Goerd, S. (2001). Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand. J. Immunol.* 53, 386–392.

Green, L.K., La Flamme, A.C., and Ackerley, D.F. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* MdaB and WrbA are water-soluble two-electron quinone oxidoreductases with the potential to defend against oxidative stress. *J. Microbiol. Seoul Korea.*

Green, S.J., Scheller, L.F., Marletta, M.A., Seguin, M.C., Klotz, F.W., Slayter, M., Nelson, B.J., and Nacy, C.A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 43, 87–94.

Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K., and Vitanza-jack, V.B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 28, 987–991.

Griffin, G.K., Newton, G., Tarrio, M.L., Bu, D., Maganto-Garcia, E., Azcutia, V., Alcaide, P., Gracie, N., Luscinskas, F.W., Croce, K.J., et al. (2012). IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 6287–6299.

Grimwood, K., Kyd, J.M., Owen, S.J., Massa, H.M., and Cripps, A.W. (2014). Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Hum. Vaccines Immunother.* 11.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 1097–1101.

Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2629–2638.

Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., and Plésiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 221–228.

Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., Ben Mkaddem, S., Coant, N., Daniel, F., and Ogier-Denis, E. (2006). [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Médecine Sci.* MS 22, 953–959.

Gupta, R.K., Chhibber, S., and Harjai, K. (2011). Acyl homoserine lactones from culture supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* accelerate host immunomodulation. *PloS One* 6, e20860.

H

Häcker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., and Wagner, H. (2000). Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.* 192, 595–600.

Halwani, M., Yebio, B., Suntres, Z.E., Alipour, M., Azghani, A.O., and Omri, A. (2008). Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1291–1297.

Hampton, T.H., Green, D.M., Cutting, G.R., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Gifford, A.H., Stanton, B.A., and O'Toole, G.A. (2014). The microbiome in pediatric cystic fibrosis patients: the role of shared environment suggests a window of intervention. *Microbiome* 2, 14.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182–187.

Hänsch, G.M., Prior, B., Brenner-Weiss, G., Obst, U., and Overhage, J. (2014). The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 12, 21–26.

Hao, N., and Whitelaw, M.L. (2013). The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem. Pharmacol.* 86, 561–570.

Harden, J.L., and Egilmez, N.K. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol. Invest.* 41, 738–764.

Hare, N.J., Scott, N.E., Shin, E.H.H., Connolly, A.M., Larsen, M.R., Palmisano, G., and Cordwell, S.J. (2011). Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* 11, 3056–3069.

Hartl, D., Griesse, M., Kappler, M., Zissel, G., Reinhardt, D., Rebhan, C., Schendel, D.J., and Krauss-Etschmann, S. (2006). Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 204–211.

Hartl, D., Gaggari, A., Bruscia, E., Hector, A., Marcos, V., Jung, A., Greene, C., McElvaney, G., Mall, M., and Döring, G. (2012). Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11, 363–382.

-
- Hashimoto, S., Pittet, J.F., Hong, K., Folkesson, H., Bagby, G., Kobzik, L., Frevert, C., Watanabe, K., Tsurufuji, S., and Wiener-Kronish, J. (1996). Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. *Am. J. Physiol.* 270, L819–L828.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., and McColley, S.A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29–70.
- Hayaishi, O. (1996). Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398, 285–289.
- Hayashi, T., Rao, S.P., Takabayashi, K., Van Uden, J.H., Kornbluth, R.S., Baird, S.M., Taylor, M.W., Carson, D.A., Catanzaro, A., and Raz, E. (2001). Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 69, 6156–6164.
- Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A., and Raz, E. (2004). Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 114, 270–279.
- Hayashi, T., Mo, J.-H., Gong, X., Rossetto, C., Jang, A., Beck, L., Elliott, G.I., Kufareva, I., Abagyan, R., Broide, D.H., et al. (2007). 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18619–18624.
- Hazan, I., Dana, R., Granot, Y., and Levy, R. (1997). Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase. *Biochem. J.* 326 (Pt 3), 867–876.
- He, X., Dai, H.-P., Chen, Q.-R., Miao, J.-B., Sun, B., Bao, N., Hu, B., Li, H., Wu, A.-S., Ban, C.-J., et al. (2013). Pneumonia relevant to lung transplantation and pathogen distribution. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 3209–3214.
- Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., and Mestecky, J.F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 144, 2253–2257.
- Henson, P.M., and Hume, D.A. (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 27, 244–250.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., and Wynn, T.A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6533–6544.
- Hirche, T.O., Benabid, R., Deslee, G., Gangloff, S., Achilefu, S., Guenounou, M., Lebarry, F., Hancock, R.E., and Belaaouaj, A. (2008). Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 4945–4954.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-
-

-
- located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77–86.
- Hoffman, L.R., D’Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171–1175.
- Hoffmann, R., van Erp, K., Trülsch, K., and Heesemann, J. (2004). Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell. Microbiol.* 6, 377–390.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- Holm, A., and Vikström, E. (2014). Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front. Plant Sci.* 5, 309.
- Hong, Y.Q., and Ghebrehiwet, B. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62, 133–138.
- Hopkins, N., Gunning, Y., O’Croinin, D.F., Laffey, J.G., and McLoughlin, P. (2006). Anti-inflammatory effect of augmented nitric oxide production in chronic lung infection. *J. Pathol.* 209, 198–205.
- Hou, D.-Y., Muller, A.J., Sharma, M.D., DuHadaway, J., Banerjee, T., Johnson, M., Mellor, A.L., Prendergast, G.C., and Munn, D.H. (2007). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res.* 67, 792–801.
- Hubbard, L.L.N., Wilke, C.A., White, E.S., and Moore, B.B. (2011). PTEN limits alveolar macrophage function against *Pseudomonas aeruginosa* after bone marrow transplantation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 1050–1058.
- Hucke, C., MacKenzie, C.R., Adjogble, K.D.Z., Takikawa, O., and Däubener, W. (2004). Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 72, 2723–2730.
- Hurley, M.N., Cámara, M., and Smyth, A.R. (2012). Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 40, 1014–1023.
- Hurtado-Nedelec, M., Csillag-Grange, M.-J., Boussetta, T., Belambri, S.A., Fay, M., Cassinat, B., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2013). Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica* 98, 1517–1524.
- Hurtado-Nedelec, M., Makni-Maalej, K., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2014). Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1124, 405–412.
-

I

Iannitti, R.G., Carvalho, A., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Casagrande, A., Zelante, T., Vacca, C., Fallarino, F., Puccetti, P., et al. (2013). Th17/Treg imbalance in murine cystic fibrosis is linked to indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency but corrected by kynurenines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 609–620.

Ibana, J.A., Belland, R.J., Zea, A.H., Schust, D.J., Nagamatsu, T., AbdelRahman, Y.M., Tate, D.J., Beatty, W.L., Aiyar, A.A., and Quayle, A.J. (2011). Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity by Levo-1-Methyl Tryptophan Blocks Gamma Interferon-Induced Chlamydia trachomatis Persistence in Human Epithelial Cells ▽. *Infect. Immun.* **79**, 4425–4437.

Iino, R., Nishino, K., Noji, H., Yamaguchi, A., and Matsumoto, Y. (2012). A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. *Front. Microbiol.* **3**, 40.

J

Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **41 Suppl 2**, S120–S126.

Jeannot, K., Fournier, D., Müller, E., Cholley, P., and Plésiat, P. (2013). Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum β -lactamase SHV-2a. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 673–675.

Jenabian, M.-A., Patel, M., Kema, I., Kanagaratham, C., Radzioch, D., Thébault, P., Lapointe, R., Tremblay, C., Gilmore, N., Ancuta, P., et al. (2013). Distinct tryptophan catabolism and Th17/Treg balance in HIV progressors and elite controllers. *PloS One* **8**, e78146.

Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., et al. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* **153**, 1329–1338.

Jensen, P.Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T., and Moser, C. (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 292–305.

Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M.J., Post, M.J., De Winther, M.P.J., and Donners, M.M.P.C. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118.

Jiang, M., Yao, J., and Feng, G. (2014). Protective effect of DNA vaccine encoding *Pseudomonas* exotoxin A and PcrV against acute pulmonary *P. aeruginosa* Infection. *PloS One* **9**, e96609.

Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **76**, 46–65.

Johnson, T.S., and Munn, D.H. (2012). Host indoleamine 2,3-dioxygenase: contribution to systemic acquired tumor tolerance. *Immunol. Invest.* **41**, 765–797.

Johnston, L.K., Rims, C.R., Gill, S.E., McGuire, J.K., and Manicone, A.M. (2012). Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 417–426.

Jürgens, B., Fuchs, D., Reichenbach, J., and Heitger, A. (2010). Intact indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human chronic granulomatous disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 137, 1–4.

K

Kahle, N.A., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., Obst, U., and Hänsch, G.M. (2013). Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1). *Immunobiology* 218, 145–151.

Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C.-H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 7, 485–495.

Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gökmen, M.R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G.M., and Jenner, R.G. (2012). T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat. Commun.* 3, 1268.

Kannan, S., Huang, H., Seeger, D., Audet, A., Chen, Y., Huang, C., Gao, H., Li, S., and Wu, M. (2009). Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. aeruginosa* infection. *PloS One* 4, e4891.

Karlsson, T., Turkina, M.V., Yakymenko, O., Magnusson, K.-E., and Vikström, E. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS Pathog.* 8, e1002953.

Kaslovsky, R.A., Gibbs, L., and Malik, A.B. (1991). Neutrophils from chronic granulomatous disease fail to increase endothelial permeability. *Am. J. Physiol.* 261, H1226–H1230.

Kerem, E., Conway, S., Elborn, S., Heijerman, H., and Consensus Committee (2005). Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 4, 7–26.

Khailova, L., Baird, C.H., Rush, A.A., McNamee, E.N., and Wischmeyer, P.E. (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG improves outcome in experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: potential role of regulatory T cells. *Shock Augusta Ga* 40, 496–503.

Khakimova, M., Ahlgren, H.G., Harrison, J.J., English, A.M., and Nguyen, D. (2013). The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J. Bacteriol.* 195, 2011–2020.

Khalil, N.M., Pepato, M.T., and Brunetti, I.L. (2008). Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissampelos sicyoides*. *Biol. Res.* 41, 165–171.

Khare, E., and Arora, N.K. (2010). Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea. *Curr. Microbiol.* 61, 64–68.

-
- Kincses, Z.T., Toldi, J., and Vécsei, L. (2010). Kynurenines, neurodegeneration and Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2045–2054.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine Mal. Infect.* 36, 78–91.
- Kiss, E.A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., and Diefenbach, A. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* 334, 1561–1565.
- Klebanoff, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625.
- Kleniewska, P., Piechota, A., Skibska, B., and Gorąca, A. (2012). The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60, 277–294.
- Klepac-Ceraj, V., Lemon, K.P., Martin, T.R., Allgaier, M., Kembel, S.W., Knapp, A.A., Lory, S., Brodie, E.L., Lynch, S.V., Bohannon, B.J.M., et al. (2010). Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 12, 1293–1303.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., and Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* 2, 150.
- Kmietowicz, Z. (2012). Trial is started to see whether gene therapy can improve lung function in cystic fibrosis. *BMJ* 344, e2141.
- Knoten, C.A., Hudson, L.L., Coleman, J.P., Farrow, J.M., 3rd, and Pesci, E.C. (2011). KynR, a Lrp/AsnC-type transcriptional regulator, directly controls the kynurenine pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 193, 6567–6575.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Peña-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte, M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., et al. (2007). TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27, 927–940.
- Koh, A.Y., Priebe, G.P., Ray, C., Van Rooijen, N., and Pier, G.B. (2009). Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 77, 5300–5310.
- Koller, B., Bals, R., Roos, D., Korting, H.C., Griesse, M., and Hartl, D. (2009). Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 39, 535–547.
- Kolpen, M., Hansen, C.R., Bjarnsholt, T., Moser, C., Christensen, L.D., van Gennip, M., Ciofu, O., Mandsberg, L., Kharazmi, A., Döring, G., et al. (2010). Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 65, 57–62.
- Kolpen, M., Bjarnsholt, T., Moser, C., Hansen, C.R., Rickelt, L.F., Kühl, M., Hempel, C., Pressler, T., Høiby, N., and Jensen, P.Ø. (2014). Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen. *Clin. Exp. Immunol.* 177, 310–319.
-

- Konan, K.V., and Taylor, M.W. (1996). Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J. Biol. Chem.* 271, 19140–19145.
- Kooguchi, K., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kitamura, Y., Kudoh, I., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (1998). Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 66, 3164–3169.
- Korns, D., Frasch, S.C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2011). Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front. Immunol.* 2, 57.
- Kragh, K.N., Alhede, M., Jensen, P.Ø., Moser, C., Scheike, T., Jacobsen, C.S., Seier, S., Eickhardt-Sørensen, S.R., Trøstrup, H., Christoffersen, L., et al. (2014). Polymorphonuclear Leukocytes Restrict the Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infect. Immun.*
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12, 231–238.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471–484.
- Kudo, Y., and Boyd, C.A. (2001). The role of L-tryptophan transport in L-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. *J. Physiol.* 531, 417–423.
- Kupz, A., Guarda, G., Gebhardt, T., Sander, L.E., Short, K.R., Diavatopoulos, D.A., Wijburg, O.L.C., Cao, H., Waithman, J.C., Chen, W., et al. (2012). NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 13, 162–169.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T., and Osterman, A. (2003). Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 227, 219–227.
- Kuroki, Y., Takahashi, M., and Nishitani, C. (2007). Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell. Microbiol.* 9, 1871–1879.
- Kvietys, P.R., and Granger, D.N. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 556–592.

L

- Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A.G., and Rooijackers, S.H.M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 386–393.
- Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 5752–5765.

-
- Laemmli, U.K., and Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* *80*, 575–599.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* *8*, 298–300.
- Laskowski, M.A., Osborn, E., and Kazmierczak, B.I. (2004). A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *54*, 1090–1103.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* *10*, 599–606.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., and Britigan, B.E. (2005). Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol.* *13*, 389–397.
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S.M., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* *113*, 717–730.
- Li, J.S., Han, Q., Fang, J., Rizzi, M., James, A.A., and Li, J. (2007). Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *64*, 74–87.
- Li, Q., Pan, C., Teng, D., Lin, L., Kou, Y., Haase, E.M., Scannapieco, F.A., and Pan, Y. (2014). Porphyromonas gingivalis modulates *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis of respiratory epithelial cells through the STAT3 signaling pathway. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *16*, 17–27.
- Li, X.J., Grunwald, D., Mathieu, J., Morel, F., and Stasia, M.-J. (2005). Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFAVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* *280*, 14962–14973.
- Lichtnekert, J., Kawakami, T., Parks, W.C., and Duffield, J.S. (2013). Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr. Opin. Pharmacol.* *13*, 555–564.
- Lillehoj, E.P., Kim, H., Chun, E.Y., and Kim, K.C. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L809–L815.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., and Martinez, J.L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19484–19489.
- Litzenburger, U.M., Opitz, C.A., Sahm, F., Rauschenbach, K.J., Trump, S., Winter, M., Ott, M., Ochs, K., Lutz, C., Liu, X., et al. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* *5*, 1038–1051.
- Liu, W., Lin, Y., Xiao, H., Xing, S., Chen, H., Chi, P., and Zhang, G. (2014). Epstein-Barr virus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocyte-derived
-

macrophages through p38/mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways: impairment in T cell functions. *J. Virol.* 88, 6660–6671.

Liu, Y., Mei, J., Gonzales, L., Yang, G., Dai, N., Wang, P., Zhang, P., Favara, M., Malcolm, K.C., Guttentag, S., et al. (2011). IL-17A and TNF- α exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 3197–3205.

Livermore, D.M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557–584.

Lopes, F., Coelho, F.M., Costa, V.V., Vieira, É.L.M., Sousa, L.P., Silva, T.A., Vieira, L.Q., Teixeira, M.M., and Pinho, V. (2011). Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 2651–2660.

Lőrincz, Á.M., Szarvas, G., Smith, S.M.E., and Ligeti, E. (2014). Role of Rac GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 65–71.

Loughman, J.A., and Hunstad, D.A. (2012). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by uropathogenic bacteria attenuates innate responses to epithelial infection. *J. Infect. Dis.* 205, 1830–1839.

Lovewell, R.R., Patankar, Y.R., and Berwin, B. (2014a). Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 306, L591–L603.

Lovewell, R.R., Hayes, S.M., O'Toole, G.A., and Berwin, B. (2014b). *Pseudomonas aeruginosa* flagellar motility activates the phagocyte PI3K/Akt pathway to induce phagocytic engulfment. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 306, L698–L707.

Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverri, J., Silva-Adaya, D., Maldonado, P.D., Torres, I., Pinzón, E., Ortiz-Islas, E., et al. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 538–547.

Lundqvist, H., and Dahlgren, C. (1996). Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 785–792.

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

M

Mackenzie, A.E., Lappin, J.E., Taylor, D.L., Nicklin, S.A., and Milligan, G. (2011). GPR35 as a Novel Therapeutic Target. *Front. Endocrinol.* 2, 68.

Maghzal, G.J., Winter, S., Wurzer, B., Chong, B.H., Holmdahl, R., and Stocker, R. (2014). Tryptophan catabolism is unaffected in chronic granulomatous disease. *Nature* 514, E16–E17.

-
- Mahenthiralingam, E., and Speert, D.P. (1995). Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. *Infect. Immun.* 63, 4519–4523.
- Makni-Maalej, K., Chiandotto, M., Hurtado-Nedelec, M., Bedouhene, S., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2013). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem. Pharmacol.* 85, 92–100.
- Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O’Callaghan, R.J., and Wright, J.R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, L409–L418.
- Mándi, Y., and Vécsei, L. (2012). The kynurenine system and immunoregulation. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 119, 197–209.
- Mandsberg, L.F., Ciofu, O., Kirkby, N., Christiansen, L.E., Poulsen, H.E., and Høiby, N. (2009). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2483–2491.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Mariencheck, W.I., Alcorn, J.F., Palmer, S.M., and Wright, J.R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 528–537.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 177, 7303–7311.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 453–461.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.
- Marx, C.J., and Lidstrom, M.E. (2002). Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* 33, 1062–1067.
- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P.W., Campbell, J.I., Jensen, P., Johnsen, A.H., Givskov, M., Ohman, D.E., Molin, S., et al. (1999). Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 6), 1349–1357.
-

-
- Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M.E., Oeda, J., Masayasu, H., and Takashima, A. (2003). Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 3010–3018.
- McAleer, J.P., and Kolls, J.K. (2011). Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J. Leukoc. Biol.* 90, 263–270.
- McAleer, J.P., and Kolls, J.K. (2014). Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol. Rev.* 260, 129–144.
- McCaslin, C.A., Petrusca, D.N., Poirier, C., Serban, K.A., Anderson, G.G., and Petrache, I. (2014). Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*
- McClure, C.D., and Schiller, N.L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Curr. Microbiol.* 33, 109–117.
- McGuigan, L., and Callaghan, M. (2014). The evolving dynamics of the microbial community in the cystic fibrosis lung. *Environ. Microbiol.*
- Méar, J.-B., Kipnis, E., Faure, E., Dessein, R., Schurtz, G., Faure, K., and Guery, B. (2013). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association? *Médecine Mal. Infect.* 43, 146–151.
- Mehta, A. (2005). CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr. Pulmonol.* 39, 292–298.
- Mei, J., Xie, X.-X., Li, M.-Q., Wei, C.-Y., Jin, L.-P., Li, D.-J., and Zhu, X.-Y. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) in human endometrial stromal cells induces macrophage tolerance through interleukin-33 in the progression of endometriosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 2743–2757.
- Menegazzi, R., Cramer, R., Patriarca, P., Scheurich, P., and Dri, P. (1994). Evidence that tumor necrosis factor alpha (TNF)-induced activation of neutrophil respiratory burst on biologic surfaces is mediated by the p55 TNF receptor. *Blood* 84, 287–293.
- Meshulam, T., Diamond, R.D., Lyman, C.A., Wysong, D.R., and Melnick, D.A. (1988). Temporal association of calcium mobilization, inositol trisphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils activated by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 532–539.
- Metz, R., Duhadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67, 7082–7087.
- Metz, R., Rust, S., Duhadaway, J.B., Mautino, M.R., Munn, D.H., Vahanian, N.N., Link, C.J., and Prendergast, G.C. (2012). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* 1, 1460–1468.
-

-
- Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959.
- Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3190–3198.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A., and Aderem, A. (2010). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3076–3080.
- Michel, T.M., Pülschen, D., and Thome, J. (2012). The role of oxidative stress in depressive disorders. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5890–5899.
- Milla, C.E., Chmiel, J.F., Accurso, F.J., VanDevanter, D.R., Konstan, M.W., Yarranton, G., Geller, D.E., and KB001 Study Group (2014). Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Pediatr. Pulmonol.* 49, 650–658.
- Miller, A.K., Brannon, M.K., Stevens, L., Johansen, H.K., Selgrade, S.E., Miller, S.I., Høiby, N., and Moskowitz, S.M. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5761–5769.
- Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell. Microbiol.* 14, 95–106.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 25, 1101–1104.
- Möller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington’s disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 117, 1001–1008.
- Moraes, T.J., Martin, R., Plumb, J.D., Vachon, E., Cameron, C.M., Danesh, A., Kelvin, D.J., Ruf, W., and Downey, G.P. (2008). Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonal infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L368–L377.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 27–32.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol.* 4, 422.
- Moser, C., Kjaergaard, S., Pressler, T., Kharazmi, A., Koch, C., and Høiby, N. (2000). The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 108, 329–335.
-

-
- Moser, C., Jensen, P.Ø., Pressler, T., Frederiksen, B., Lanng, S., Kharazmi, A., Koch, C., and Høiby, N. (2005). Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *113*, 400–409.
- Al Moussawi, K., and Kazmierczak, B.I. (2014). Distinct contributions of Interleukin (IL)-1 α and IL-1 β to innate immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung. *Infect. Immun.*
- Moyano, A.J., Tobares, R.A., Rizzi, Y.S., Krapp, A.R., Mondotte, J.A., Bocco, J.L., Saleh, M.-C., Carrillo, N., and Smania, A.M. (2014). A long-chain flavodoxin protects *Pseudomonas aeruginosa* from oxidative stress and host bacterial clearance. *PLoS Genet.* *10*, e1004163.
- Mueller, T.D., Zhang, J.-L., Sebald, W., and Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 237–250.
- Mukae, H., Urabe, K., Yanagihara, K., Ishimoto, H., Sakamoto, N., Ishii, H., Nakayama, S., Ishimatsu, Y., Abe, K., Shirai, R., et al. (2010). Low expression of T-cell co-stimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tohoku J. Exp. Med.* *220*, 59–65.
- Mukundan, L., Odegaard, J.I., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mwangi, J.W., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goh, Y.P.S., Eagle, A.R., Dunn, S.E., Awakuni, J.U.H., et al. (2009). PPAR- δ senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat. Med.* *15*, 1266–1272.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ. Microbiol.* *12*, 1621–1629.
- Muller, C., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1211–1221.
- Müller, N., Myint, A.-M., and Schwarz, M.J. (2011). Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 130–136.
- Munck, A. (2013). Mucoviscidose : nouvelles thérapies ciblant les mutations du gène CFTR. *Rev. Mal. Respir. Actual.* *5*, 681–685.
- Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* *34*, 137–143.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., and Mellor, A.L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 4100–4110.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* *22*, 633–642.
-

Murphy, B.S., Sundareshan, V., Cory, T.J., Hayes, D., Anstead, M.I., and Feola, D.J. (2008). Azithromycin alters macrophage phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* *61*, 554–560.

Murphy, B.S., Bush, H.M., Sundareshan, V., Davis, C., Hagadone, J., Cory, T.J., Hoy, H., Hayes, D., Jr, Anstead, M.I., and Feola, D.J. (2010). Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* *9*, 314–322.

Mustafi, S., Rivero, N., Olson, J.C., Stahl, P.D., and Barbieri, M.A. (2013). Regulation of Rab5 function during phagocytosis of live *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages. *Infect. Immun.* *81*, 2426–2436.

N

Nakajima, S., and Kitamura, M. (2013). Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 162–174.

Nalca, Y., Jansch, L., Bredenbruch, F., Geffers, R., Buer, J., and Häussler, S. (2006). Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1680–1688.

Narui, K., Noguchi, N., Saito, A., Kakimi, K., Motomura, N., Kubo, K., Takamoto, S., and Sasatsu, M. (2009). Anti-infectious activity of tryptophan metabolites in the L-tryptophan-L-kynurenine pathway. *Biol. Pharm. Bull.* *32*, 41–44.

Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* *111*, 769–778.

Nguyen, N.T., Hanieh, H., Nakahama, T., and Kishimoto, T. (2013). The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int. Immunol.* *25*, 335–343.

Niño-Castro, A., Abdullah, Z., Popov, A., Thabet, Y., Beyer, M., Knolle, P., Domann, E., Chakraborty, T., Schmidt, S.V., and Schultze, J.L. (2014). The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against *Listeria monocytogenes*. *Innate Immun.* *20*, 401–411.

Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., Kohno, T., Sawada, N., Himi, T., and Kojima, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir. Res.* *15*, 21.

Nuutila, J., and Lilius, E.-M. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *65*, 93–102.

O

O'Connor, J.C., André, C., Wang, Y., Lawson, M.A., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 4200–4209.

Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 194, 781–795.

Ohmori, Y., and Hamilton, T.A. (2000). Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 275, 38095–38103.

Okuma, M., Tokuyama, T., Senoh, S., Hirata, F., and Hayaishi, O. (1976). Antagonism of 5-hydroxykynurenamine against serotonin action on platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 643–645.

Olivares, J., Alvarez-Ortega, C., Linares, J.F., Rojo, F., Köhler, T., and Martínez, J.L. (2012). Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ. Microbiol.* 14, 1968–1981.

Oliver, A., and Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 798–808.

Oliver, A., Baquero, F., and Blázquez, J. (2002). The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.* 43, 1641–1650.

O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Spitz, D.R., Denning, G.M., and Britigan, B.E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L94–L103.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Opitz, U., Sahm, F., Ochs, K., Lutz, C., Wick, W., and Platten, M. (2011). The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e19823.

Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20828–20833.

P

Painter, R.G., Valentine, V.G., Lanson, N.A., Leidal, K., Zhang, Q., Lombard, G., Thompson, C., Viswanathan, A., Nauseef, W.M., Wang, G., et al. (2006). CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 10260–10269.

Painter, R.G., Bonvillain, R.W., Valentine, V.G., Lombard, G.A., LaPlace, S.G., Nauseef, W.M., and Wang, G. (2008). The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1345–1353.

-
- Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* 12, 870–878.
- Palmer, G.C., Jorth, P.A., and Whiteley, M. (2013). The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. *Microbiol. Read. Engl.* 159, 959–969.
- Palmer, K.L., Mashburn, L.M., Singh, P.K., and Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J. Bacteriol.* 187, 5267–5277.
- Palmer, K.L., Aye, L.M., and Whiteley, M. (2007). Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J. Bacteriol.* 189, 8079–8087.
- Palmer, L.J., Cooper, P.R., Ling, M.R., Wright, H.J., Huissoon, A., and Chapple, I.L.C. (2012). Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 261–268.
- Papadopoulos, C.J., Carson, C.F., Chang, B.J., and Riley, T.V. (2008). Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1932–1935.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691.
- Parada, M.T., Alba, A., and Sepúlveda, C. (2010). Early and late infections in lung transplantation patients. *Transplant. Proc.* 42, 333–335.
- Park, D., Tosello-Tramont, A.-C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450, 430–434.
- Park, S.-Y., Heo, Y.-J., Choi, Y.-S., Déziel, E., and Cho, Y.-H. (2005). Conserved virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* are required for killing *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Seoul Korea* 43, 443–450.
- Park, S.-Y., Jung, M.-Y., Kim, H.-J., Lee, S.-J., Kim, S.-Y., Lee, B.-H., Kwon, T.-H., Park, R.-W., and Kim, I.-S. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 15, 192–201.
- Parker, H., and Winterbourn, C.C. (2012). Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 3, 424.
- Parker, D., Cohen, T.S., Alhede, M., Harfenist, B.S., Martin, F.J., and Prince, A. (2012a). Induction of type I interferon signaling by *Pseudomonas aeruginosa* is diminished in cystic fibrosis epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 6–13.
-

-
- Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M.B., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2012b). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 92, 841–849.
- Patankar, Y.R., Lovewell, R.R., Poynter, M.E., Jyot, J., Kazmierczak, B.I., and Berwin, B. (2013). Flagellar motility is a key determinant of the magnitude of the inflammasome response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 81, 2043–2052.
- Patten, C.L., and Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220.
- Peluso, L., de Luca, C., Bozza, S., Leonardi, A., Giovannini, G., Lavorgna, A., De Rosa, G., Mascolo, M., Ortega De Luna, L., Catania, M.R., et al. (2010). Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. *BMC Microbiol.* 10, 9.
- Perrier, P., Martinez, F.O., Locati, M., Bianchi, G., Nebuloni, M., Vago, G., Bazzoni, F., Sozzani, S., Allavena, P., and Mantovani, A. (2004). Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 7031–7042.
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K., and Waltenbaugh, C. (1998). Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3071–3076.
- Pier, G.B., Grout, M., and Zaidi, T.S. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12088–12093.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627.
- Pison, C., Magnan, A., Botturi, K., Sève, M., Brouard, S., Marsland, B.J., Ernst, F., Paprotka, T., Deplanche, K., Fritz, A., et al. (2014). Prediction of chronic lung allograft dysfunction: a systems medicine challenge. *Eur. Respir. J.* 43, 689–693.
- Planès, R., and Bahraoui, E. (2013). HIV-1 Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived-dendritic cells through a direct mechanism: effect on T cells proliferation. *PloS One* 8, e74551.
- Plangar, I., Majlath, Z., and Vecsei, L. (2012). Kynurenines in cognitive functions: their possible role in depression. *Neuropsychopharmacol. Hung. Magy. Pszichofarmakológiai Egyes. Lapja Off. J. Hung. Assoc. Psychopharmacol.* 14, 239–244.
- Platten, M., Wick, W., and Van den Eynde, B.J. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res.* 72, 5435–5440.
- Platzer, B., Richter, S., Kneidinger, D., Waltenberger, D., Woisetschlager, M., and Strobl, H. (2009). Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 66–74.
-

- Polack, B., Dacheux, D., Delic-Attree, I., Toussaint, B., and Vignais, P.M. (1996). Role of manganese superoxide dismutase in a mucoid isolate of *Pseudomonas aeruginosa*: adaptation to oxidative stress. *Infect. Immun.* 64, 2216–2219.
- Poljak, A., Grant, R., Austin, C.J.D., Jamie, J.F., Willows, R.D., Takikawa, O., Littlejohn, T.K., Truscott, R.J.W., Walker, M.J., Sachdev, P., et al. (2006). Inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase activity by H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 450, 9–19.
- Pomfret, D.W., Schenck, K.W., Fludzinski, P., and Cohen, M.L. (1987). Interaction of 5-hydroxykynurenamine, L-kynurenine and kynuramine with multiple serotonin receptors in smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 465–471.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 479–487.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2, 65.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.-C., Léone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., and Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 481–489.
- Pott, G.B., Beard, K.S., Bryan, C.L., Merrick, D.T., and Shapiro, L. (2013). Alpha-1 antitrypsin reduces severity of *Pseudomonas pneumonia* in mice and inhibits epithelial barrier disruption and *Pseudomonas* invasion of respiratory epithelial cells. *Front. Public Health* 1, 19.
- Powell, J.D., Pollizzi, K.N., Heikamp, E.B., and Horton, M.R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 39–68.
- Pressler, T., Karpati, F., Granström, M., Knudsen, P.K., Lindblad, A., Hjelte, L., Olesen, H.V., Meyer, P., Høiby, N., and Scandinavian CF Study Consortium (2009). Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 37–42.
- Price, K.E., Hampton, T.H., Gifford, A.H., Dolben, E.L., Hogan, D.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., and O'Toole, G.A. (2013). Unique microbial communities persist in individual cystic fibrosis patients throughout a clinical exacerbation. *Microbiome* 1, 27.
- Prince, L.R., Bianchi, S.M., Vaughan, K.M., Bewley, M.A., Marriott, H.M., Walmsley, S.R., Taylor, G.W., Buttle, D.J., Sabroe, I., Dockrell, D.H., et al. (2008). Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 3502–3511.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3159–3164.

Q

- Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zheng, J.Z., Shi, X., Flynn, D.C., and Jiang, B.-H. (2004). PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C153–C163.

Quénée, L., Lamotte, D., and Polack, B. (2005). Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* 38, 63–67.

Quinton, P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421–422.

Rada, B., Jendrysik, M.A., Pang, L., Hayes, C.P., Yoo, D.-G., Park, J.J., Moskowitz, S.M., Malech, H.L., and Leto, T.L. (2013). Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PloS One* 8, e54205.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899–1902.

Ramphal, R., Balloy, V., Jyot, J., Verma, A., Si-Tahar, M., and Chignard, M. (2008). Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 586–592.

Ravichandran, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 207, 1807–1817.

R

De Ravin, S.S., Zarembek, K.A., Long-Priel, D., Chan, K.C., Fox, S.D., Gallin, J.I., Kuhns, D.B., and Malech, H.L. (2010). Tryptophan/kynurenine metabolism in human leukocytes is independent of superoxide and is fully maintained in chronic granulomatous disease. *Blood* 116, 1755–1760.

Read, R.C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., and Taylor, G. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 72, 2271–2277.

Reid, D.W., Latham, R., Lamont, I.L., Camara, M., and Roddam, L.F. (2013). Molecular analysis of changes in *Pseudomonas aeruginosa* load during treatment of a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 12, 688–699.

Reiniger, N., Lee, M.M., Coleman, F.T., Ray, C., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2007). Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect. Immun.* 75, 1598–1608.

Reszka, K.J., Xiong, Y., Sallans, L., Pasula, R., Olakanmi, O., Hassett, D.J., and Britigan, B.E. (2012). Inactivation of the potent *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin pyocyanin by airway peroxidases and nitrite. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1044–L1056.

Rey-Giraud, F., Hafner, M., and Ries, C.H. (2012). In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PloS One* 7, e42656.

Ritchie, A.J., Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., and Cooley, M.A. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine

- lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect. Immun.* 73, 1648–1655.
- Rivas Caldas, R., and Boisramé, S. (2014). Upper aero-digestive contamination by *Pseudomonas aeruginosa* and implications in Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*
- Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. (2005). The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 25, 20–30.
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., and Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4783–4788.
- Rogan, M.P., Taggart, C.C., Greene, C.M., Murphy, P.G., O'Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 190, 1245–1253.
- Rogers, G.B., van der Gast, C.J., and Serisier, D.J. (2014). Predominant pathogen competition and core microbiota divergence in chronic airway infection. *ISME J.*
- Roghanian, A., Drost, E.M., MacNee, W., Howie, S.E.M., and Sallenave, J.-M. (2006). Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1189–1198.
- Romani, L., Fallarino, F., De Luca, A., Montagnoli, C., D'Angelo, C., Zelante, T., Vacca, C., Bistoni, F., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2008). Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 451, 211–215.
- Romsang, A., Atichartpongkul, S., Trinachartvanit, W., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2013). Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress. *J. Bacteriol.* 195, 3299–3308.
- Le Rond, S., Gonzalez, A., Gonzalez, A.S.L., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (2005). Indoleamine 2,3 dioxygenase and human leucocyte antigen-G inhibit the T-cell alloproliferative response through two independent pathways. *Immunology* 116, 297–307.
- Roszer, T., Menéndez-Gutiérrez, M.P., Lefterova, M.I., Alameda, D., Núñez, V., Lazar, M.A., Fischer, T., and Ricote, M. (2011). Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 621–631.
- Rothlin, C.V., Ghosh, S., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B.A., and Lemke, G. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 131, 1124–1136.
- Rovere, P., Peri, G., Fazzini, F., Bottazzi, B., Doni, A., Bondanza, A., Zimmermann, V.S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M.G., et al. (2000). The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 96, 4300–4306.

S

- Sadikot, R.T., Zeng, H., Yull, F.E., Li, B., Cheng, D., Kernodle, D.S., Jansen, E.D., Contag, C.H., Segal, B.H., Holland, S.M., et al. (2004). p47phox deficiency impairs NF-kappa B activation and host defense in *Pseudomonas pneumonia*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 1801–1808.
- Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., Bartosz, G., and Rachel, M. (2014). Oxidative modification of proteins in pediatric cystic fibrosis with bacterial infections. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 389629.
- Dos Santos, G., Kutuzov, M.A., and Ridge, K.M. (2012). The inflammasome in lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L627–L633.
- Satoh, S., Oishi, K., Iwagaki, A., Senba, M., Akaike, T., Akiyama, M., Mukaida, N., Atsushima, K.M., and Nagatake, T. (2001). Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 126, 266–273.
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., et al. (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11, 936–944.
- Savill, J., Hogg, N., and Haslett, C. (1991). Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 99, 6S – 7S.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205–218.
- Scheel-Toellner, D., Wang, K., Craddock, R., Webb, P.R., McGettrick, H.M., Assi, L.K., Parkes, N., Clough, L.E., Gulbins, E., Salmon, M., et al. (2004). Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 104, 2557–2564.
- Schmidt, S.V., and Schultze, J.L. (2014). New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front. Immunol.* 5, 384.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479–490.
- Schroeder, T.H., Lee, M.M., Yacono, P.W., Cannon, C.L., Gerçeker, A.A., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6907–6912.
-

-
- Schultz, M.J., Rijneveld, A.W., Florquin, S., Edwards, C.K., Dinarello, C.A., and van der Poll, T. (2002). Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L285–L290.
- Schultz, M.J., Knapp, S., Florquin, S., Pater, J., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T. (2003). Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 71, 1630–1634.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185, 2066–2079.
- Shan, Q., Dwyer, M., Rahman, S., and Gadjeva, M. (2014). Distinct Susceptibilities of Corneal *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates to Neutrophil Extracellular Trap-Mediated Immunity. *Infect. Immun.* 82, 4135–4143.
- Sharma, M.D., Hou, D.-Y., Liu, Y., Koni, P.A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A.L., He, Y., and Munn, D.H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3⁺ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113, 6102–6111.
- Shen, D.-K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B., and Toussaint, B. (2008). High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 2195–2208.
- Shin, H.-S., Lee, J.-H., Paek, S.-H., Jung, Y.W., and Ha, U.-H. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*-dependent upregulation of TLR2 influences host responses to a secondary *Staphylococcus aureus* infection. *Pathog. Dis.* 69, 149–156.
- Silva, N.M., Rodrigues, C.V., Santoro, M.M., Reis, L.F.L., Alvarez-Leite, J.I., and Gazzinelli, R.T. (2002). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.* 70, 859–868.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1, 784–791.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417, 552–555.
- Sironi, M., Martinez, F.O., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., Iellem, A., Cassatella, M.A., Van Damme, J., et al. (2006). Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J. Leukoc. Biol.* 80, 342–349.
- Skerrett, S.J., Wilson, C.B., Liggitt, H.D., and Hajjar, A.M. (2007). Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L312–L322.
-

-
- Skindersoe, M.E., Zeuthen, L.H., Brix, S., Fink, L.N., Lazenby, J., Whittall, C., Williams, P., Diggle, S.P., Froekiaer, H., Cooley, M., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55, 335–345.
- Smith, D.J., Badrick, A.C., Zakrzewski, M., Krause, L., Bell, S.C., Anderson, G.J., and Reid, D.W. (2014). Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. *Eur. Respir. J.*
- Smyth, A.R., Bell, S.C., Bojcin, S., Bryon, M., Duff, A., Flume, P., Kashirskaya, N., Munck, A., Ratjen, F., Schwarzenberg, S.J., et al. (2014). European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13 Suppl 1, S23–S42.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., and LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390.
- Souza, A.W.S. de, Mesquita Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Cruvinel, W. de M., Andrade, L.E.C., and Silva, N.P. da (2010). Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Rev. Bras. Reumatol.* 50, 665–679.
- Stasia, M.J., and Li, X.J. (2008). Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin. Immunopathol.* 30, 209–235.
- Stasia, M.J., Brion, J.-P., Boutonnat, J., and Morel, F. (2003). Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91-) in 3 brothers with a point mutation in the promoter region of CYBB. *J. Infect. Dis.* 188, 1593–1604.
- Stephens, G.L., Wang, Q., Swerdlow, B., Bhat, G., Kolbeck, R., and Fung, M. (2013). Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur. J. Immunol.* 43, 1727–1734.
- Stockinger, B., Veldhoen, M., and Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 19, 353–361.
- Stockinger, B., Hirota, K., Duarte, J., and Veldhoen, M. (2011). External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin. Immunol.* 23, 99–105.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Sublette, M.E., and Postolache, T.T. (2012). Neuroinflammation and depression: the role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) as a molecular pathway. *Psychosom. Med.* 74, 668–672.
- Sun, Y., Chin, Y.E., Weisiger, E., Malter, C., Tawara, I., Toubai, T., Gatz, E., Mascagni, P., Dinarello, C.A., and Reddy, P. (2009). Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5899–5903.
-

Sun, Y.V., Boverhof, D.R., Burgoon, L.D., Fielden, M.R., and Zacharewski, T.R. (2004). Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32, 4512–4523.

Suna, S., Sakata, Y., Shimizu, M., Nakatani, D., Usami, M., Matsumoto, S., Mizuno, H., Ozaki, K., Takashima, S., Takeda, H., et al. (2009). Lymphotoxin- α 3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF- κ B signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 374–378.

Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Salgame, P., and Mosser, D.M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *J. Exp. Med.* 188, 217–222.

Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* 204, 3235–3245.

Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, Z.S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., et al. (2010). STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* 33, 699–712.

Szekanecz, Z., and Koch, A.E. (2001). Chemokines and angiogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 202–208.

T

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S.-I., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., et al. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243–249.

Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9.

Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 71, 5785–5793.

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S., Bycroft, B.W., and Pritchard, D.I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* 66, 36–42.

Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* 67, 2371–2376.

Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196, 447–457.

- Thomas, S.R., and Stocker, R. (1999). Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 4, 199–220.
- Thomas, S.R., Mohr, D., and Stocker, R. (1994). Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 14457–14464.
- Thomas, S.R., Salahifar, H., Mashima, R., Hunt, N.H., Richardson, D.R., and Stocker, R. (2001). Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 6332–6340.
- Thompson, M.D., Hendy, G.N., Percy, M.E., Bichet, D.G., and Cole, D.E.C. (2014). G protein-coupled receptor mutations and human genetic disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1175, 153–187.
- Thorburn, A.N., Macia, L., and Mackay, C.R. (2014). Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. *Immunity* 40, 833–842.
- Tiringer, K., Treis, A., Fucik, P., Gona, M., Gruber, S., Renner, S., Dehlink, E., Nachbaur, E., Horak, F., Jaksch, P., et al. (2013). A Th17- and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 621–629.
- Tiszlavicz, Z., Németh, B., Fülöp, F., Vécsei, L., Tápai, K., Ocsovszky, I., and Mándi, Y. (2011). Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor- α (TNF- α) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 383, 447–455.
- Töröcsik, D., Bárdos, H., Nagy, L., and Adány, R. (2005). Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 2132–2139.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 416–421.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.-D.V., and Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–1374.
- Truman, L.A., Ford, C.A., Pasikowska, M., Pound, J.D., Wilkinson, S.J., Dumitriu, I.E., Melville, L., Melrose, L.A., Ogden, C.A., Nibbs, R., et al. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 112, 5026–5036.
- Tsai, H.-C., Velichko, S., Hung, L.-Y., and Wu, R. (2013). IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 267971.

Tsai, W.C., Strieter, R.M., Mehrad, B., Newstead, M.W., Zeng, X., and Standiford, T.J. (2000). CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 68, 4289–4296.

Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1135–1144.

U

Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M.D., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., Iwakura, Y., et al. (2007). IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 3786–3796.

V

Valenti, P., Berlutti, F., Conte, M.P., Longhi, C., and Seganti, L. (2004). Lactoferrin functions: current status and perspectives. *J. Clin. Gastroenterol.* 38, S127–S129.

Valledor, A.F., and Ricote, M. (2004). Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 67, 201–212.

Vandivier, R.W., Fadok, V.A., Ogden, C.A., Hoffmann, P.R., Brain, J.D., Accurso, F.J., Fisher, J.H., Greene, K.E., and Henson, P.M. (2002). Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest* 121, 89S.

Vandivier, R.W., Richens, T.R., Horstmann, S.A., deCathelineau, A.M., Ghosh, M., Reynolds, S.D., Xiao, Y.-Q., Riches, D.W., Plumb, J., Vachon, E., et al. (2009). Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L677–L686.

Vasil, M.L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108, 800–805.

Verhoeven, A.J., Visser, G., van Zwieten, R., Gruszczynska, B., Tien Poll-The, D.W., and Smit, G.P. (1999). A convenient diagnostic function test of peripheral blood neutrophils in glycogen storage disease type Ib. *Pediatr. Res.* 45, 881–885.

Vikström, E., Tafazoli, F., and Magnusson, K.-E. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 580, 6921–6928.

Vinckx, T., Matthijs, S., and Cornelis, P. (2008). Loss of the oxidative stress regulator OxyR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 impairs growth under iron-limited conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 288, 258–265.

W

Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewski, B.H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185, 2080–2095.

-
- Walker, T.S., Tomlin, K.L., Worthen, G.S., Poch, K.R., Lieber, J.G., Saavedra, M.T., Fessler, M.B., Malcolm, K.C., Vasil, M.L., and Nick, J.A. (2005). Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 3693–3701.
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., and Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* 281, 22021–22028.
- Wang, X.-F., Wang, H.-S., Wang, H., Zhang, F., Wang, K.-F., Guo, Q., Zhang, G., Cai, S.-H., and Du, J. (2014a). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cell. Immunol.* 289, 42–48.
- Wang, X.-F., Wang, H.-S., Wang, H., Zhang, F., Wang, K.-F., Guo, Q., Zhang, G., Cai, S.-H., and Du, J. (2014b). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cell. Immunol.* 289, 42–48.
- Wang, Y., Gouëllec, A.L., Chaker, H., Asrih, H., Polack, B., and Toussaint, B. (2012). Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 35, 223–234.
- Ware, L.B., and Matthay, M.A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342, 1334–1349.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677–688.
- Van de Weert-van Leeuwen, P.B., Van Meegen, M.A., Speirs, J.J., Pals, D.J., Rooijackers, S.H.M., Van der Ent, C.K., Terheggen-Lagro, S.W.J., Arets, H.G.M., and Beekman, J.M. (2013). Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes is cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 463–470.
- Weiss, M., Blazek, K., Byrne, A.J., Perocheau, D.P., and Udalova, I.A. (2013). IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. *Mediators Inflamm.* 2013, 245804.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148, 81–86.
- Westritschnig, K., Hochreiter, R., Wallner, G., Firbas, C., Schwameis, M., and Jilma, B. (2014). A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 170–183.
- Westwell, A.D. (2004). The therapeutic potential of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists in anticancer drug development. *Drugs Future* 29, 479.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.
-

- Whitmore, L.C., Hilkin, B.M., Goss, K.L., Wahle, E.M., Colaizy, T.T., Boggiatto, P.M., Varga, S.M., Miller, F.J., and Moreland, J.G. (2013). NOX2 protects against prolonged inflammation, lung injury, and mortality following systemic insults. *J. Innate Immun.* 5, 565–580.
- Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirol. Carlton Vic* 15, 1037–1056.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 441, 890–893.
- Willner, D.L., Hugenholtz, P., Yerkovich, S.T., Tan, M.E., Daly, J.N., Lachner, N., Hopkins, P.M., and Chambers, D.C. (2013). Reestablishment of recipient-associated microbiota in the lung allograft is linked to reduced risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 640–647.
- Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., and Flemming, H.C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* 336, 302–314.
- Winterbourn, C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278–286.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735.
- Worgall, S., Kikuchi, T., Singh, R., Martushova, K., Lande, L., and Crystal, R.G. (2001). Protection against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells. *Infect. Immun.* 69, 4521–4527.
- Wrann, C.D., Tabriz, N.A., Barkhausen, T., Klos, A., van Griensven, M., Pape, H.C., Kendoff, D.O., Guo, R., Ward, P.A., Krettek, C., et al. (2007). The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 5940–5948.
- Wu, W., Huang, J., Duan, B., Traficante, D.C., Hong, H., Risech, M., Lory, S., and Priebe, G.P. (2012). Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 420–427.

X

- Xu, H., Zhang, G.-X., Ciric, B., and Rostami, A. (2008a). IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol. Lett.* 121, 1–6.
- Xu, H., Oriss, T.B., Fei, M., Henry, A.C., Melgert, B.N., Chen, L., Mellor, A.L., Munn, D.H., Irvin, C.G., Ray, P., et al. (2008b). Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6690–6695.
- Xu, W., Zhao, X., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2013). Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol. Immunol.* 53, 179–186.

Xu, X., Shao, B., Wang, R., Zhou, S., Tang, Z., Lu, W., and Xiong, S. (2014). Role of Interleukin-17 in defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in lungs. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 809–816.

Y

Yamamori, T., Inanami, O., Sumimoto, H., Akasaki, T., Nagahata, H., and Kuwabara, M. (2002). Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1571–1578.

Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O., and Kido, R. (1985). Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem. J.* 230, 635–638.

Yasui, K., Kobayashi, N., Yamazaki, T., Agematsu, K., Matsuzaki, S., Ito, S., Nakata, S., Baba, A., and Koike, K. (2005). Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. *Free Radic. Res.* 39, 755–762.

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519–527.

Yokoyama, K., Ishijima, S.A., Clowney, L., Koike, H., Aramaki, H., Tanaka, C., Makino, K., and Suzuki, M. (2006). Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 89–108.

Yoo, D., Winn, M., Pang, L., Moskowitz, S.M., Malech, H.L., Leto, T.L., and Rada, B. (2014a). Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 4728–4738.

Yoo, D., Floyd, M., Winn, M., Moskowitz, S.M., and Rada, B. (2014b). NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol. Lett.* 160, 186–194.

Young, R.L., Malcolm, K.C., Kret, J.E., Caceres, S.M., Poch, K.R., Nichols, D.P., Taylor-Cousar, J.L., Saavedra, M.T., Randell, S.H., Vasil, M.L., et al. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PloS One* 6, e23637.

Yuasa, H.J., Ushigoe, A., and Ball, H.J. (2011). Molecular evolution of bacterial indoleamine 2,3-dioxygenase. *Gene* 485, 22–31.

Z

Zádori, D., Klivényi, P., Toldi, J., Fülöp, F., and Vécsei, L. (2012). Kynurenines in Parkinson's disease: therapeutic perspectives. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 119, 275–283.

-
- Zaknun, D., Schroecksnadel, S., Kurz, K., and Fuchs, D. (2012). Potential role of antioxidant food supplements, preservatives and colorants in the pathogenesis of allergy and asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157, 113–124.
- Zegarra-Moran, O., Folli, C., Manzari, B., Ravazzolo, R., Varesio, L., and Galletta, L.J.V. (2004). Double mechanism for apical tryptophan depletion in polarized human bronchial epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 542–549.
- Zemanick, E.T., Harris, J.K., Wagner, B.D., Robertson, C.E., Sagel, S.D., Stevens, M.J., Accurso, F.J., and Laguna, T.A. (2013). Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PloS One* 8, e62917.
- Zhang, W., Xu, W., and Xiong, S. (2010a). Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 6465–6478.
- Zhang, Y., Kang, S.A., Mukherjee, T., Bale, S., Crane, B.R., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2007). Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 145–155.
- Zhang, Y., Li, X., Grassmé, H., Döring, G., and Gulbins, E. (2010b). Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 5104–5111.
- Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezinskaya, Y., Linnoila, I., and Liu, Z.-G. (2013). ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res.* 23, 898–914.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569.
- Zielenski, J., and Tsui, L.C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genet.* 29, 777–807.
- Zimmermann, S., Wagner, C., Müller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., and Hänsch, G.M. (2006). Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* 74, 5687–5692.
- Zummo, F.P., Marineo, S., Pace, A., Civiletti, F., Giardina, A., and Puglia, A.M. (2012). Tryptophan catabolism via kynurenine production in *Streptomyces coelicolor*: identification of three genes coding for the enzymes of tryptophan to anthranilate pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 719–728.
-

Liste des communications

Publication :

- **Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing.** Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, Stasia MJ. (2014) *Free Radic Biol Med* 73:400-10.

Communications orales :

- **Dialogue inter-règles entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée. Rôle de la production de L-kynurénine par les bactéries.** Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, Stasia MJ.

Réunion du GDR Pseudomonas, 23 au 25 novembre 2014, Carry-le Rouet, France.

- **Le rôle des dérivés du tryptophane dans le dialogue inter-règles entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité. A la recherche d'une nouvelle cible thérapeutique.** Genestet C., Le Gouellec A., Chaker H., Méar J.B., Guery B., Toussaint B., Stasia M.J.

15ème colloque des jeunes chercheurs français sur la mucoviscidose, 18 février 2014, Institut Pasteur, Paris, France.

- **Le rôle des dérivés du tryptophane dans le dialogue inter-règles entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité. A la recherche d'une nouvelle cible thérapeutique.** Genestet C., Le Gouellec A., Chaker H., Méar J.B., Guery B., Toussaint B., Stasia M.J.

Réunion du GDR Pseudomonas, 15 et 17 octobre 2013, Loulans-Verchamps, France.

- **Role of kynurenine in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and immune cells.** Genestet C., Le Gouellec A., Guery B., Toussaint B., Stasia MJ.

7ème colloque des jeunes chercheurs Européens sur la mucoviscidose, 27 février au 1er mars 2013, Institut Pasteur, Paris, France.

Communications affichées :

- **Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing.** Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, Stasia MJ.

Gordon Research Conference, NOX Family NADPH Oxidases, 18 au 23 mai 2014, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort, Lucca (Barga), Italy.

- **Role of tryptophan derivatives during the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and the immune cells. Looking for a new therapeutic target.** Genestet C., Le Gouellec A., Chaker H. Guery B., Stasia M.J., Toussaint B.

14ème conférence internationale sur Pseudomonas, 07 au 11 septembre 2013, Université de Lausanne, Suisse.

- **Role of kynurenine in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and immune cells.** Genestet C., Le Gouellec A., Guery B., Toussaint B., Stasia M.J.

Journée de la Recherche médicale, 07 juin 2013, Université de Médecine/Pharmacie de Grenoble, France.

7ème colloque des jeunes chercheurs Européens sur la mucoviscidose, 27 février au 1er mars 2013, Institut Pasteur, Paris, France.

14ème colloque des jeunes chercheurs français sur la mucoviscidose, 26 février 2013, Institut Pasteur, Paris, France.

- **Rôle de la kynurénine dans les infections broncho-pulmonaires par *Pseudomonas aeruginosa*. A la recherche d'une nouvelle cible thérapeutique.** Chaker H., Genestet C., Le Gouellec A., Méar J.B., Guery B., Stasia MJ., Toussaint B.

13ème colloque des jeunes chercheurs français sur la mucoviscidose, 24 avril 2012, Institut Pasteur de Paris, France.

Pseudomonas aeruginosa is responsible for persistent infections in cystic fibrosis patients, suggesting an ability to circumvent innate immune defenses. Many host cells produce kynurenine, which is known to control immune system homeostasis. Interestingly this bacterium uses the kynurenine pathway to catabolize tryptophan. In addition, preliminary results of our laboratory showed that during acute pulmonary infection in mice with a strain of *P. aeruginosa* which does not produce kynurenine, there is a loss of virulence (reduction of mice mortality and pulmonary bacterial burden). The aim of this study is to investigate the role of kynurenine metabolism in the interaction between *P. aeruginosa* and immune system cells, in particular neutrophils and macrophages.

We showed that most strains of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients produce a high level of kynurenine. Moreover, a strong transcriptional activation of *kynA* (the first gene involved in the kynurenine pathway in *P. aeruginosa*) was observed upon contact with immune cells and particularly with neutrophils and macrophages. In addition, using coculture of human neutrophils with various mutant strains of *P. aeruginosa* producing variable levels of kynurenine, we demonstrated that kynurenine promotes bacterial survival. Increasing amounts of synthetic kynurenine inhibits reactive oxygen species (ROS) production by the NADPH oxidase of activated neutrophils, as evaluated by chemiluminescence with luminol or isoluminol or superoxide dismutase-sensitive cytochrome *c* reduction assay. This inhibition is due neither to a phagocytosis defect nor to direct NADPH oxidase inhibition. Using *in vitro* ROS-producing systems, we showed that kynurenine scavenges hydrogen peroxide and, to a lesser extent, superoxide anions. Kynurenine's scavenging effect occurs mainly intracellularly after bacterial stimulation, probably in the phagosome. We also confirmed that neutrophils do not express the kynurenine receptor, the arylhydrocarbon receptor (AhR). Conversely, macrophages express this receptor and the kynurenine induces its expression after 48h of activation by *P. aeruginosa* or LPS (lipopolysaccharide). After activation, kynurenine impacts also macrophage polarization, analysed by flow cytometry, by stabilizing immunosuppressive phenotype M2c.

Finally, the first enzyme of the kynurenine pathway of *P. aeruginosa* was produced, purified and characterized. We demonstrated that KynA is an allosteric enzyme, with a K' of 10,8 mM of L-tryptophan, a V_m of 2862 nM/min and a K_{cat} of 4,09 M of N-formylkynurenine/min/M of enzyme, indicating a possible regulation at the enzymatic level of the kynurenine pathway. Furthermore, the substrate analogue (L-1-methyl-tryptophan) inhibits slightly the pure enzyme, but has no effect on bacterial culture.

In conclusion, the kynurenine pathway allows *P. aeruginosa* to circumvent the innate immune response. The kynurenine pathway of *P. aeruginosa* could be a new therapeutic target. Purified recombinant enzyme KynA is a new tool that could help to screen specific inhibitors.

Key words : kynurenine, *Pseudomonas aeruginosa*, innate immunity, interkingdom dialogue

Pseudomonas aeruginosa est responsable d'infections persistantes chez les patients atteints de mucoviscidose, suggérant une capacité à mettre en échec les défenses immunitaires innées. Par ailleurs, nous savons que les cellules de l'hôte produisent de la kynurénine, exerçant un contrôle sur l'homéostasie du système immunitaire. Or, la bactérie elle-même produit de la kynurénine. Des résultats préliminaires de notre équipe ont montré que lors d'une infection pulmonaire aiguë chez la souris par une souche de *P. aeruginosa* ne produisant pas de kynurénine, il y a une perte de virulence (diminution de la mortalité des souris et de la charge bactérienne pulmonaire). Le but de notre travail est donc d'examiner le rôle du métabolisme de la kynurénine durant l'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules de système immunitaire, en particulier les neutrophiles et les macrophages.

Nous avons montré que la plupart des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose produit un niveau élevé de kynurénine. De plus, une forte activation transcriptionnelle de *kynA* (le premier gène de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa*) a été observée lors du contact avec les cellules de l'immunité, en particulier les neutrophiles et les macrophages. Durant la co-culture des neutrophiles humains avec différentes souches mutantes de *P. aeruginosa*, produisant des niveaux variables de kynurénine, nous avons démontré que la kynurénine favorise la survie des bactéries. De plus la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase des neutrophiles activés (évaluée par chimioluminescence en présence de luminol ou d'isoluminol ou par test de réduction du cytochrome *c* sensible à la superoxyde dismutase) est inhibée par des doses croissantes de kynurénine synthétique. Cette inhibition n'est due ni à un défaut de phagocytose ni à une inhibition directe de la NADPH oxydase. En utilisant des systèmes de production *in vitro* de FRO, nous avons montré que la kynurénine est un "scavenger" du peroxyde d'hydrogène et, dans une moindre mesure, des anions superoxydes. Ce "scavenging" a lieu principalement en intracellulaire lors de la stimulation par les bactéries, probablement dans le phagosome. Nous avons également confirmé que les neutrophiles n'expriment pas le récepteur de la kynurénine, le récepteur d'aryl-hydrocarbène (AhR). A l'inverse, les macrophages expriment ce récepteur et son expression est induite par la kynurénine 48h après activation par *P. aeruginosa* ou par du LPS (lipopolysaccharide). La kynurénine a également un impact sur la polarisation des macrophages, étudiée par cytométrie en flux, en stabilisant le phénotype immunosuppresseur M2c.

Enfin, la première enzyme de la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* a été produite, purifiée et caractérisée. Nous avons démontré que KynA est une enzyme allostérique, avec un K' pour le L-tryptophane de 10,8 mM, une V_m de 2862 nM/min, et un K_{cat} de 4,09 M de N-formylkynurénine/min/M d'enzyme, indiquant une possible régulation au niveau enzymatique de la voie des kynurénines. Par ailleurs, l'analogue du substrat (le L-1-méthyl-tryptophane) inhibe légèrement l'enzyme pure, mais n'a pas d'effet sur une culture bactérienne.

Pour conclure, nous avons montré au cours de ce projet que la voie des kynurénines de *P. aeruginosa* est un des mécanismes qui permet à cette bactérie d'échapper au système immunitaire inné. La voie des kynurénines de *P. aeruginosa* pourrait donc être une nouvelle cible thérapeutique. L'enzyme recombinante KynA purifiée est un nouvel outil qui pourrait permettre de cribler des inhibiteurs spécifiques.

Mots clés : kynurénine, *Pseudomonas aeruginosa*, immunité innée, dialogue inter-règnes
