INRS-Institut Armand Frappier

Étude de la production des 4-hydroxy-2-alkylquinolines chez *Pseudomonas aeruginosa.*

Par
Marie-Hélène Castonguay

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Réjean Beaudet, INRS Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Roger Lévesque, Université Laval
Directeur de recherche	François Lépine, INRS Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Marie-Hélène Castonguay, 2007

Résumé

Plusieurs bactéries pathogènes dépendent du quorum sensing (QS) pour coloniser et infecter leur hôte. Il en est de même avec la bactérie ubiquitaire à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*. Celle-ci est souvent associée aux patients immunodéprimés ainsi que ceux affectés par la fibrose kystique. Le QS régule l'expression des gènes dépendamment de la densité cellulaire. Il permet aux bactéries individuelles se retrouvant dans une population locale de coordonner l'expression de certains gènes, les aidant à agir en tant qu'organisme multicellulaire. Le QS agit à travers l'échange de petites molécules signal entre bactéries rapprochées. Lorsque la population augmente, la concentration du signal augmente. Après un moment, le seuil de concentration aura atteint un niveau capable d'activer l'expression de facteurs de virulence et ce en synergie avec les bactéries environnantes. Des mutants ayant un système de QS non fonctionnel seront habituellement avirulents ou verront leur potentiel infectieux réduit de manière significative.

Chez *P. aeruginosa,* les deux principaux signaux cellulaires contrôlant le quorum sensing sont le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) et N-(butanoyl)-L-homosérine lactone (C4-HSL). Récemment, un troisième signal cellulaire a été décrit chez *P. aeruginosa*, le 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline ou Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). Le PQS semble être impliqué dans la hiérarchie de la régulation génétique du QS chez *P. aeruginosa* et sa présence est requise pour l'expression de nombreux facteurs de virulence. Le PQS fait partie de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines ou HAQ dont certains membres sont aussi des agents antibactériens. Le travail consistait en l'étude du système enzymatique codé par les gènes *pqsA-D* responsables de la synthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. L'acide anthranilique est précurseur de tous les HAQ. Il réagit avec des acides gras substitués en position bêta par une fonction cétone. Le composé intermédiaire subit une réaction de cyclisation formant le noyau quinoline commun aux HAQ. Certains des gènes de l'opéron *pqsA-D* présentent des similarités de séquences peptidiques avec des protéines transporteuses de la fonction acyle (ACP). Celles-ci sont soupçonnées de fixer la fonction acyle des cétoacides, à l'aide d'un lien

covalent. L'opéron *phnAB* code pour l'anthranilate synthase, un des gènes impliqués dans la synthèse de l'acide anthranilique. Cet opéron ainsi que l'opéron *pqsABCD* sont inactivés dans un mutant *mvfR* et sont directement impliqués dans la synthèse des HAQ.

Différentes molécules ont été choisies par homologie de structure par rapport à l'acide anthranilique. L'hypothèse émise était que ces molécules sont capables de se fixer à la cétoacide liée aux ACP pour ensuite inhiber la production de HAQ. Afin de déterminer la capacité d'inhibition, ces molécules ont été ajoutées individuellement à des cultures de *P. aeruginosa*. Un test de compétition avec le précurseur des HAQ a été réalisé afin de vérifier la réversibilité du lien créé. Les résultats obtenus suggèrent que l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque, l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque ainsi que l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque sont capable d'inhiber la production de HHQ, de PQS et du N-oxide dans des cultures en milieu liquide. De plus, ces inhibiteurs agissent différemment en présence du substrat naturel. Nous avons aussi pu identifier un co-inducteur du régulateur transcriptionnel MvfR. Finalement, la recherche d'un intermédiaire de biosynthèse des HAQ a aussi été effectuée à l'aide de la chromatographie sur couche mince avec des préparations provenant des mutants *pqsA* et *pqsD*. Toutes les analyses ont été réalisées par spectrométrie de masse.

Étudiante

Directeur de recherche

À Gratien et Louise pour leurs encouragements,
de la maternelle à la maîtrise.

Chercheur : scientifique à qui on ne peut reprocher de ne rien trouver,
puisqu'il est payé pour chercher. (Michel Lauzière)

Remerciements

Je voudrais avant tout remercier mon directeur de recherche François Lépine de m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant que candidate à la maîtrise. Je suis reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée tout au long du projet. Merci d'avoir partagé ton enthousiasme et ta grande expertise du monde de la spectrométrie de masse, les réunions chez Merck Frosst et ton implication dans ma recherche d'emploi.

Je voudrais aussi remercier Éric Déziel pour ses si nombreuses idées, son dynamisme et son positivisme. Merci de m'avoir permis de terminer mes travaux dans ton tout nouveau laboratoire. Merci pour les discussions enrichissantes tant au point de vue scientifique que personnelle.

Sans oublier Sylvain Milot qui m'a offert un support technique très apprécié tout au long de ces deux années. Merci pour ton assistance, ton ingéniosité et ta bonne humeur. Anne-Pascale, merci de ta présence, milles fois merci! Et Valérie, avec qui j'ai partagé l'opéron de mon sujet de recherche…

Je suis à la fois reconnaissante à l'Institut Armand-Frappier pour son cadre d'enseignement exceptionnel ainsi qu'à la Fondation pour son support financier.

Enfin, un grand merci au groupe de microbiologie de l'environnement… bien sûr sans oublier les autres! Merci pour l'ambiance de travail agréable, les échanges de cadeaux, les soirées et les sorties de groupe. J'y ai trouvé de nombreux amis.

Liste des figures

Figure 1.1: La fréquence relative des différents types d'infections nosocomiales.. 10

Figure 1.2: Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*.. 18

Figure 1.3: Les acylhomosérines lactones chez *P. aeruginosa* 29

Figure 1.4: Structures des cinq familles de HAQ. 32

Figure 1.5: La biosynthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. 33

Figure 1.6: Fonction problable des enzymes de l'opéron 35

Figure 1.7: Contrôle du quorum sensing chez *P. aeruginosa*..... 36

Figure 1.8: Modèle de communication cellulaire HHQ/PQS. 38

Figure 1.9: Transcription des gènes par le système *las*. 44

Figure 1.10: Empêcher l'induction du QS en inhibant les facteurs régulant *lasR* et *lasI* (*rhlR* et *rhlI*).. 47

Figure 1.11: Du métabolite à la drogue.. 49

Figure 1.12: Analogues de l'acide anthranilique.. 50

Figure 3.1: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 par la souche PA14..... 64

Figure 3.2: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM de 2-aminoacétophénone (2AA) dans le milieu de culture. 64

Figure 3.3: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'anthranilate de méthyle (MA) dans le milieu de culture..... 65

Figure 3.4: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl) dans le milieu de culture..... 65

Figure 3.5: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'alcool 2-aminobenzylique (2ABA) dans le milieu de culture..... 66

Figure 3.6: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl) dans le milieu de culture. 66

Figure 3.7: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F) dans le milieu de culture. 67

Figure 3.8: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide N-méthylanthranilique (NMAA) dans le milieu de culture. 67

Figure 3.9: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F) dans le milieu de culture. 68

Figure 3.10: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F) dans le milieu de culture. 68

Figure 3.11: Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 2-nitrobenzoïque (2NB) dans le milieu de culture. 69

Figure 3.12: Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'anthranilate de méthyle (MA) et de 1.5 mM de 2-aminoacétophénone (2AA)..... 72

Figure 3.13: Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl) et de 1.5 mM d'alcool 2-aminobenzylique (2ABA). 72

Figure 3.14: Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl), de 1.5 mM d'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F) et de 1.5 mM d'acide N-méthylanthranilique (NMAA). 73

Figure 3.15: Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F), de 1.5 mM d'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F) et de 1.5 mM d'acide 2-nitrobenzoïque (2NB). 74

Figure 3.16: Disparition dans le temps des inhibiteurs ajoutés à 1.5 mM au milieu de culture LB de la souche PA14. 75

Figure 3.17: Cinétique de production de l'acide anthranilique de PA14 en culture avec des inhibiteurs..... 77

Figure 3.18: Cinétique de production de l'acide anthranilique chez un mutant pqsA et de la souche sauvage PA14. 78

Figure 3.19: Courbes de croissance d'une culture de PA14 mis en présence de différentes concentrations d'acide anthranilique. 79

Figure 3.20: Production des HAQ totaux en présence des inhibiteurs et de l'addition de trois différentes concentrations d'acide anthranilique 80

Figure 3.21: Extraction au chloroforme de la pyocyanine produite après 24 heures de croissance de PA14 en présence de différents inhibiteurs. 81

Figure 3.22: Courbe de croissance de *E. coli* pDN18 + pLG12 et sa production en HHQ C7, C9 et C11. 83

Figure 3.23: Courbes de croissance des cultures supplémentées au temps 0 en HHQd4 et en PQSd4 comparées au contrôle. 84

Figure 3.24: Production du HHQ chez *E. coli* pDN18+pLG12 suite à l'ajout de PQSd4 et de HHQd4 vers la fin de la phase exponentielle de croissance. 85

Figure 3.25: Production du HHQ chez *E. coli* pDN18+pLG12 suite à l'ajout de PQSd4 et de HHQd4 au début de la phase stationnaire après 12 heures de croissance. 85

Figure 3.26: Intermédiaires hypothétiques de la biosynthèse des HAQ. 87

Figure 3.27: Conditions de séparations de la chromatographie sur couche mince vue à deux longueurs d'ondes, 254 et 366 nm. 87

Figure 3.28: Comparaison de la migration en deux dimensions des extraits totaux de PA14 et des mutants *pqsA* et *pqsC* extraits à l'acétate d'éthyle. 88

Figure 3.29: Comparaison des chromatographies sur couche mince des cultures radioactives et non-radioactives du mutant *pqsA*. 89

Figure 3.30: Comparaison des chromatographies sur couche mince des cultures radioactives et non-radioactives du mutant *pqsC*. 90

Figure 3.31: Dimensions 3 et 4 à 254 nm des composés non séparés lors de la première chromatographie sur couche mince. 91

Figure 3.32: Vue des plaques chromatographiques en 3^{ième} et 4^{ième} dimensions sous U.V. à 254 et 366 nm ainsi qu'au PhosphorImager des extraits de la souche PA14 et des mutants *pqsA* et *pqsC*. 92

Figure 3.33: Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant de la souche PA14 vus au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm. 93

Figure 3.34: Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant du mutant *pqsA* vus au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm. 94

Figure 3.35: Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant du mutant *pqsC* vus au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm. 94

Figure 3.36: Migration en 2D vue à 366 nm d'un extrait d'une culture de 500 mL du mutant *pqsC*..... 95

Figure 3.37: Gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes du surnageant et des fractions membranaires et cytoplasmiques des mutants *pqsA*, pqsC et de la souche sauvage PA14.. 97

Figure 3.38: Gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes du surnageant et des fractions membranaires et cytoplasmiques des mutants *pqsA* (pLG12), *pqsA* (pLG14) et de la souche sauvage PA14.. 98

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Facteurs de virulences contrôlés par le système de quorum sensing chez *P. aeruginosa.* 41

Tableau 2.1: Souches et plasmides utilisées lors de l'expérimentation 53

Tableau 2.2: Les inhibiteurs 55

Tableau 2.3: Les temps de prélèvements 56

Tableau 3.1: Pourcentage de la réduction de la production des HAQ en présence de différents inhibiteurs 69

Tableau 3.2: Résultats des critères de sélection des inhibiteurs potentiels 76

Liste des abréviations

2AA	2-aminoacétophénone
2ABA	Alcool 2-aminobenzylique
2NB	Acide 2-nitrobenzoïque
3-oxo-C_{12}-HSL	N-3-oxododécanoyl-L-homosérine lactone
4Cl	Acide 4-chloro-2-aminobenzoïque
4F	Acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque
5F	Acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque
6Cl	Acide 6-chloro-2-aminobenzoïque
6F	Acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque
C_4-HSL	N-butanoyl-L-homosérine lactone
AA	Acide anthranilique
AA-d4	Acide anthranilique tetradeutéré
A. xylosoxidans	*Achromobacter xylosoxidans*
ACP	« Acyl carrier protein », protéine transporteuse de la fonction acyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acylhomosérine lactone
Amp.	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
B. cepacia	*Burkholderia cepacia*
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFTR	« Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
CL/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectromètrie de masse
D. pulchra	*Delisea pulchra*
H. influenzae	*Haemophilus influenzae*
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinolines
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HHQ-d4	4-hydroxy-2-heptylquinoline tetradeutéré
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance

HQNO	4-hydroxy-2-nonylquinoline N-oxide
HQNO-d4	4-hydroxy-2-nonylquinoline N-oxide tetradeutéré
LB	Milieu Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Anthranilate de méthyle
NMAA	Acide N-méthylanthranilique
NNIS	National nosocomial infections surveillance
ORFs	« Open reading frame », cadre de lecture ouvert
PMN	Leucocytes polymorphonucléaires
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PQS	2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline, « Pseudomonas quinolone signal »
PQS-d4	2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone tetradeutéré
QS	Quorum sensing
SAM	méthionine S-adénosyle
SDS	Sodium dodécyl sulfate
S. aureus	*Staphyloccocus aureus*
S. maltophilia	*Stenotrophomonas maltophilia*
D.O.	Densité optique
Rf	Facteur de rétention
RPM	révolutions par minute
U.V.	Ultra-violet

Table des matières

Résumé III
Remerciements IX
Liste des figures XI
Liste des tableaux XV
Liste des abréviations XVII
Table des matières XIX

Introduction 1

Chapitre I 5
Revue de littérature

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* 7

1.2 Le génome des souches PAO1 et PA14 8

1.3 Les infections nosocomiales 9

1.4 La Fibrose kystique et *P. aeruginosa* 11

1.5 La formation de biofilms 13

1.6 La résistance aux antibiotiques 15

1.7 Les facteurs de virulence 16
1.7.1 Les facteurs de virulences associés à la cellule bactérienne 18
1.7.1.1 OpfR 19
1.7.1.2 Le pili de type IV 19
1.7.1.3 Le flagelle 19
1.7.1.4 Les lipopolysaccharides 20
1.7.2 Les facteurs de virulence extracellulaires 20
1.7.2.1 La protéase alcaline 21
1.7.2.2 Les élastases LasA et LasB 21
1.7.2.3 Les rhamnolipides 22

1.7.2.4 La pyocyanine 23
1.7.2.5 Les sidérophores 24
1.7.2.6 L'alginate 25

1.8 Le quorum sensing 26

1.8.1 Le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* 28
1.8.2 La biosynthèse des 4-hydroxy-2-alkylquinolines 30
1.8.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR 34
1.8.4 La régulation du quorum sensing 36
1.8.5 La communication cellulaire 37
1.8.6 Le quorum sensing et la formation de biofilms 39
1.8.7 Le quorum sensing et les facteurs de virulence 40
1.8.8 Le quorum sensing et la réponse immunitaire 43
1.8.9 Les inhibiteurs du quorum sensing 43
1.8.9.1 Les antagonistes des acylhomosérines lactones 44
1.8.9.2 Les anticorps 45
1.8.9.3 La lactonase 46
1.8.9.4 La biosynthèse des acides gras 46
1.8.9.5 Les facteurs de régulation 47
1.8.9.6 Les oligonucléotides antisens 47
1.8.9.7 Des inhibiteurs prometteurs 48
1.8.9.8 Le précurseur des HAQ 49

Chapitre II 51

Matériel et méthodes

2.1 Les souches utilisées 53

2.2 Les milieux de croissance 54

2.3 L'inoculation et la croissance des souches 54

2.4 Les inhibiteurs 54

2.5 Les courbes de croissance 55

2.6 Les extractions au méthanol 56

2.7 Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse 56

2.8 La quantification 57

2.9 Les extractions au chloroforme 57

2.10 Les extractions à l'acétate d'éthyle 57

2.11 La chromatographie sur plaque de silice 58

2.12 Le PhosphorImager 59

2.13 Les extractions cytoplasmiques 59

2.14 Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes 59

2.15 Coloration des protéines au bleu de coomassie 60

2.16 L'autoradiographie 60

Chapitre III 61

Résultats

3.1 La sélection des inhibiteurs 63

3.1.1 L'inhibition de la production des HAQ 63
3.1.2 Les courbes de croissance 71
3.1.3 La disparition des inhibiteurs dans le milieu 74

3.2 Le mode d'action des inhibiteurs 77

3.2.1 La cinétique de production de l'acide anthranilique 77
3.2.2 Le test de compétition 78
3.2.3 La production de la pyocyanine 80

3.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR 82

3.4 L'intermédiaire de biosynthèse des HAQ 86
3.4.1 Chromatographie sur couche mince 87
3.4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 96

Chapitre IV 99
Discussion

4.1 La sélection des inhibiteurs 102

4.2 Le mode d'action des inhibiteurs 106

4.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR 109

4.4 Recherche d'un intermédiaire de biosynthèse des HAQ 111
4.4.1 La chromatographie sur couche mince 111
4.4.2 L'électrophorèse sur gel non-dénaturant 113

Conclusion 117

Références 121

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négative possédant un métabolisme très versatile lui permettant de proliférer dans plusieurs types d'environnements. Sa capacité à produire plusieurs facteurs de virulence lui permet de causer des infections opportunistes telles que des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. Sa grande capacité d'adaptation à des environnements hostiles ainsi que ses nombreux facteurs de virulence lui permettent de prendre avantage de situations particulières pour infecter plusieurs hôtes tels que les végétaux, les insectes et les animaux. Chez l'humain, ce pathogène opportuniste est la cause d'un taux élevé de morbidité et de mortalité (Salyers et Whitt, 2002). La résistance intrinsèque de ce microorganisme à plusieurs désinfectants et antibiotiques communs lui est conférée par ses nombreuses pompes membranaires (Poole, 2001). Cette résistance ainsi que sa capacité à produire un biofilm rend donc ce pathogène difficile à éradiquer.

La production de différents facteurs de virulence est contrôlée via une petite molécule signal connue sous le nom de Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) permettant de coordonner l'expression des gènes de la population bactérienne au sein de l'hôte. Produites et rejetées dans des conditions particulières, ces molécules sont ensuite récupérées par d'autres cellules bactériennes environnantes. Un tel système de communication intercellulaire permet à une population bactérienne de réguler l'expression de ses gènes de virulence en réponse à la densité cellulaire. Il permet aux cellules individuelles de se coordonner et d'agir en synergie en tant que communauté.

Chez *P. aeruginosa* souche PA14, le PQS sert de lien régulateur entre la cascade des systèmes LasR1 et RhlR1 servant à moduler l'expression de différents gènes dont des facteurs de virulence en réponse à des concentrations croissantes de N-acyl-L-homosérine lactones (AHL), l'oxo-C12-HSL et le C4-HSL. Contrairement aux AHL impliquées dans le système de quorum sensing chez les bactéries Gram négatives, le PQS est un composé ayant une structure 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HAQ). Le régulateur transcriptionnel

MvfR contrôle la synthèse des HAQ dont l'expression est assurée via l'opéron *pqsA-E* codant pour des enzymes qui catalysent la biosynthèse de 5 classes de HAQ.

L'acide anthranilique est le précurseur de tous les HAQ (Déziel *et al.*, 2004). Ceci est en accord avec les travaux antérieurs de Ritter et Luckner (Ritter et Luckner, 1971), et plus récemment avec ceux de Bredenbruch *et al.*, (Bredenbruch *et al.*, 2005) qui ont démontré que l'acide anthranilique se couple à des acides gras substitués en position bêta par une fonction cétone. Le composé intermédiaire subit ensuite une réaction de cyclisation pour former le noyau quinoline commun aux HAQ. Vraisemblablement cette cyclisation s'effectue par l'activation de la fonction carbonyle de l'acide anthranilique, qui serait attaquée par la fonction méthylène adjacente aux groupements acide et cétonique du cétoacide. Le gène *pqsA*, de l'opéron *pqsABCD*, est responsable de la synthèse des HAQ et présente des similarités de séquences avec des protéines responsables de l'activation de la fonction carboxyle de composés aromatiques comme l'acide 4- ou 2-hydroxybenzoïque. Il a été récemment démontré par Calfee *et al.* en 2001 que l'anthranilate de méthyle, un analogue structurel de l'acide anthranilique, dont la fonction ester empêche l'activation de la fonction carboxyle, inhibait la formation du PQS. Il semblerait que cette inhibition de la synthèse de PQS serait due a l'inhibition de la synthèse du HHQ le précurseur immédiat du PQS (Lépine *et al.*, 2004). Il nous apparaît donc que des composés chimiques présentant des analogies de structures avec l'acide anthranilique pourraient inhiber la synthèse des HAQ, possiblement suite à l'inhibition de l'activité de PqsA, que l'on soupçonne être l'enzyme responsable de l'activation de la fonction carbonyle de l'acide anthranilique.

MvfR est un régulateur transcriptionnel du système de quorum sensing (Cao *et al.*, 2001) et contrôle l'expression de 143 gènes, incluant les opérons *pqsA-E* et *phnAB*, tout comme de multiple gènes associés à la virulence de *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2005; Gallagher *et al.*, 2002; McKnight, Iglewski et Pesci, 2000; Pesci *et al.*, 1999). C'est un régulateur de type LysR dont la partie C-terminal contient un site de liaison à un ligand. De plus, l'activation de MvfR dépend de sa liaison à un co-inducteur spécifique, possiblement le produit d'un chemin de biosynthèse régulé par MvfR et relié à la virulence de la bactérie

(Schell, 1993). Il a d'ailleurs déjà été rapporté que le PQS augmente l'affinité de liaison de MvfR à l'ADN (Wade *et al.*, 2005). L'identification d'un co-inducteur de MvfR pourrait mener à la découverte d'une nouvelle cible permettant de bloquer l'activité de MvfR et de limiter les infections à *Pseudomonas aeruginosa.*

Le présent projet de recherche consiste en l'étude du système enzymatique codé par les gènes *pqsA-D* responsables de la synthèse des HAQ chez *P. aeruginosa.* Trois volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord, l'inhibition des HAQ en présence d'inhibiteurs partageant une similarité structurelle avec l'acide anthranilique. De plus, nous avons voulu connaître le type d'interaction entre le substrat (inhibiteur) et la protéine transporteuse de la fonction acyle (ACP), afin de déterminer le chemin de la biosynthèse des HAQ. Finalement, nous avons comparé la cinétique de production de l'acide anthranilique chez un mutant *pqsA* avec la souche sauvage PA14 en présence de différents inhibiteurs.

Dans le second volet, nous nous sommes concentrés sur le régulateur transcriptionnel MvfR. Nous savons que la présence de PQS augmente *in vitro* l'affinité de MvfR au site de liaison du promoteur de l'opéron *pqsA-E* (Wade *et al.*, 2005). Cependant, un mutant *pqsH*, abolissant totalement la transformation du HHQ en PQS maintient l'expression des gènes de l'opéron *pqsA-E.* De plus, la virulence de la bactérie n'est pas réduite, comparativement à des mutants *mvfR.* Nous soupçonnons donc qu'une seconde molécule pourrait agir en tant que co-inducteur de MvfR. À cette fin, nous avons démontré que le HHQ ainsi que le PQS sont deux co-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR.

Dans la troisième partie du projet nous avons tenté d'isoler un intermédiaire de la biosynthèse ainsi qu'une protéine de type ACP afin d'élucider la production des HAQ chez *P. aeruginosa* PA14.

Chapitre I

Revue de littérature

1.1 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif membre de la famille des *Pseudomonadaceae* (Brenner, Staley et Krieg, 2001; Winslow *et al.*, 1917). Capable de se déplacer à l'aide de son flagelle polaire, ce microorganisme versatile et ubiquitaire est communément retrouvé dans l'environnement, incluant le sol et l'eau (Brenner, Staley et Krieg, 2001). *P. aeruginosa* a un potentiel infectieux très large lui permettant de s'attaquer aux plantes, aux insectes, nématodes et vertébrés, incluant l'humain (Mahajan-Miklos, Rahme et Ausubel, 2000; Rahme *et al.*, 2000).

C'est un organisme chimiohétérotrophe qui obtient ses sources métaboliques d'énergie, d'hydrogène, d'électrons et de carbone par l'oxydation de molécules organiques réduites. Souvent la même source organique satisfait tous ses besoins. *P. aeruginosa* est un organisme aérobie, ayant un métabolisme de type strictement oxydatif et non fermentaire, l'oxygène étant l'accepteur final d'électron. Essentiellement, tous les microorganismes pathogènes sont chimiohétérotrophe (Prescott, Harley et Klein, 1995).

En culture, un des critères d'identification de *P. aeruginosa* est la production d'un pigment bleu-vert appelé pyocyanine (Hart et Shears, 1997). Il s'agit d'un pigment diffusible, soluble dans l'eau et fluorescent en présence de la lumière ultraviolette (Prescott, Harley et Klein, 1995). Un autre critère intéressant est l'odeur sucrée de raisin, une caractéristique qui a longtemps été importante dans le diagnostique rapide de la présence de *P. aeruginosa* dans les cultures ou les blessures thermiques. Le composé responsable de cette odeur est le 2-aminoacétophénone (Cox et Parker, 1979).

De manière générale, les pseudomonades ont un impact pratique très important. Plusieurs de ces espèces bactériennes ont la capacité de dégrader une grande variété de molécules organiques. Elles sont aussi importantes dans le processus de minéralisation naturel et dans le traitement des déchets. Certaines pseudomonades interviennent de manière non désirée dans le quotidien de l'homme. Ce sont des agents pathogènes animaux et végétaux importants. Capables de se développer à 4°C, ils dégradent les lipides et les

protéines que l'on retrouve dans le lait, les viandes et les œufs. Finalement, *P. aeruginosa* est un microorganisme important dont l'étude à fait progresser les connaissances en physiologie et en biochimie microbienne (Prescott, Harley et Klein, 1995).

1.2 Le génome des souches PAO1 et PA14

La séquence complète du génome de *P. aeruginosa* est maintenant connue. La première souche de l'espèce à avoir été séquencée est PAO1. Elle a été choisie parmi tant d'autres pour son usage répandu dans de nombreux laboratoires à travers le monde pour des fins d'études génétiques et physiologiques, sur une période de 50 ans. Le projet de séquençage de la souche PAO1 s'est terminé en l'an 2000 (Stover *et al.*, 2000). La souche PA14 est un isolat clinique capable d'infecter des plantes comme *Arabidopsis thaliana* ainsi que les animaux, dont des souris (Rahme *et al.*, 1995). Certains facteurs de virulence utilisés par PA14 sont les mêmes lors de l'infection de la plante ou de l'animal. La souche PA14 a déjà été utilisée afin d'étudier les gènes codant des facteurs de virulence dans l'infection d'une grande diversité d'hôtes dont les plantes, les nématodes, les insectes ainsi qu'un modèle de souris présentant des blessures thermiques (Rahme *et al.*, 2000; Rahme *et al.*, 1995; Rahme *et al.*, 1997).

Les résultats de séquençage du génome de la souche PA14 ont été comparés à ceux de la souche PAO1. Ils ont montré que la capacité de *P. aeruginosa* à se maintenir dans une très grande diversité de niches écologiques semble se refléter dans son contenu génétique (Kulasekara et Lory, 2004). *P. aeruginosa* possède une capacité codante comparable à celle d'un eucaryote comme *Saccharomyces cerevisiea*. Au total, 5,570 cadres de lectures ouverts (ORFs) codent pour des séquences protéiniques, le génome est hautement régulé avec 341 régulateurs transcriptionnels et comprend 3,058 gènes de fonction connue et 748 gènes conservés de fonction inconnue (Stover *et al.*, 2000; Kiewitz, Weinel et Tummler, 2002).

Ce projet d'une valeur inestimable a favorisé la collaboration de la communauté scientifique se concentrant sur l'étude de *P. aeruginosa* afin de regrouper la description

des gènes étudiés dont la fonction est connue. La description du génome de *P. aeruginosa* PAO1 peut ainsi être considéré comme l'une des plus détaillée et complète de tous les projets de séquençage de génomes bactériens (Kulasekara et Lory, 2004). Des informations peuvent continuellement être soumises et consultées grâce au site Internet du « Pseudomonas Genome Project » [www.pseudomonas.com].

1.3 Les infections nosocomiales

Une propriété remarquable de *P. aeruginosa* est sa capacité de causer des infections chez une grande variété d'hôtes incluant insectes, plantes et animaux, illustrant bien sa capacité d'adaptation à diverses niches écologiques (Mahajan-Miklos, Rahme et Ausubel, 2000). Chez l'humain, *P. aeruginosa* peut coloniser pratiquement toutes les muqueuses et peut envahir le sang et les tissus. Ces infections peuvent être superficielles et de courte durée. Elles peuvent aussi se changer en bactériémies pouvant causer la mort ou devenir chroniques comme dans le cas des patients souffrant de fibrose kystique (Lyczak, Cannon et Pier, 2002; Lynch, 2001; Rajan et Saiman, 2002). Cette bactérie a été reconnue dans plusieurs études comme étant la cause de méningites, de dermatites, d'otites externes, de kératites ulcéreuses chez les utilisateurs de lentilles cornéennes ainsi que d'endocardites chez les toxicomanes s'injectant des narcotiques par voie intraveineuse (Salyers & Whitt, 2002; Bodey *et al.*, 1983). On dit de *P. aeruginosa* qu'il est un microorganisme pathogène opportuniste. Il s'agit d'une bactérie habituellement inoffensive, un commensal naturel se trouvant à la surface de la peau ainsi que dans l'intestin de 10 à 25% des gens en bonne santé (Nicas et Iglewski, 1985).

Le « Center for Disease Control » estime que 5 à 10% des patients hospitalisés contracteront une infection nosocomiale. Avec 40 millions d'hospitalisations par année, 2 à 4 millions d'infections contractées à l'hôpital représentent une proportion significative des maladies infectieuses contractées par l'humain. Les patients traités aux soins intensifs sont plus à risque suite à l'utilisation d'appareils invasifs créant des portes d'entrée aux microorganismes opportunistes. Les bactériémies comptent pour environ 14% des infections nosocomiales (NNIS System Report, 2004).

Plus de patients meurent d'infections nosocomiales du tractus respiratoire (pneumonies nosocomiales) comparativement à n'importe qu'elle autre maladie acquise à l'hôpital. La plupart de ces pneumonies sont liées à l'utilisation d'appareils favorisant la respiration suite à une intubation et une ventilation endotrachéale (Zanetti *et al.*, 2003). Elles représentent 31% des cas d'infections nosocomiales. L'infection des plaies chirurgicales compte pour 9% des infections. Les infections urinaires sont des cas courants liés à l'emploi de cathéters urinaires et représentent 23% des maladies contractées à l'hôpital (fig. 1.1) (NNIS System Report, 2004).

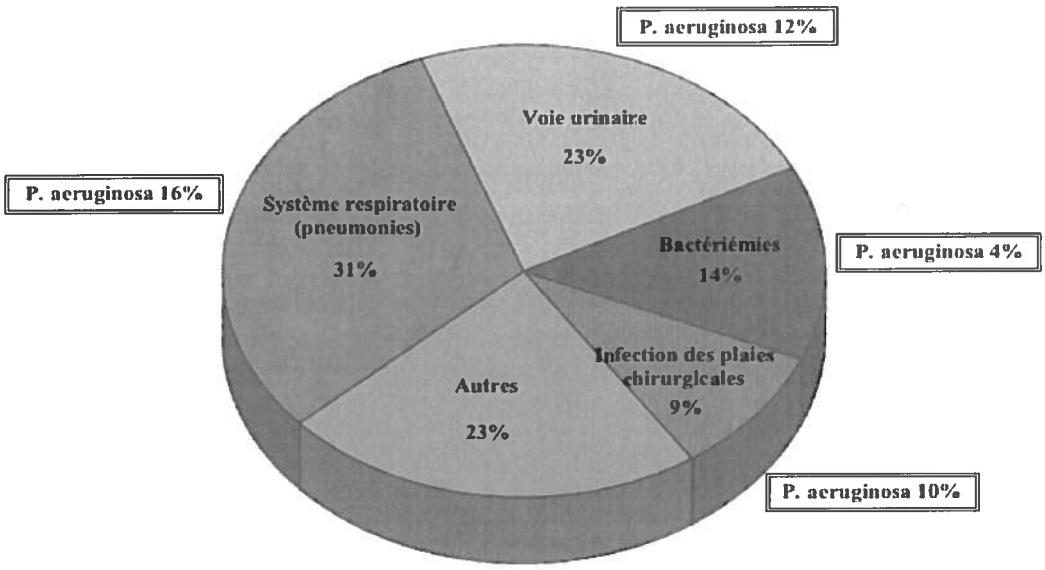


Figure 1.1 La fréquence relative des différents types d'infections nosocomiales. La présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les cas de maladies contractées à l'hôpital selon le NNIS et Santé Canada. Figure adaptée de Trautmann et al., (2005) et Richards et al., (2000).

P. aeruginosa est donc devenu un important pathogène dans les hôpitaux, responsable de diverses infections nosocomiales (Fabian, 2000). C'est le pathogène opportuniste principal des septicémies et d'infections de la peau chez les grands brûlés (Gang *et al.*, 1999). Il est souvent la source des infections pulmonaires aigües chez les patients immunodéprimés (patients atteints de leucémies, SIDA, cancer) ou ayant inhalé de l'air chaud lors d'un incendie. Cette bactérie résiste aux traitements antibiotiques et est la première cause de mortalité chez les patients ayant la fibrose kystique (Lyczak, Cannon

et Pier, 2002). Quatre-vingt pourcent de ces patients ayant plus de 26 ans ont leurs poumons colonisés par cette bactérie (Govan et Deretic, 1996). Enfin, *P. aeruginosa* est la quatrième cause d'infections nosocomiales et la principale concernant les pneumonies acquises en milieu hospitalier (Cunha, 2002). *P. aeruginosa* est un danger permanent pour les patients devenus neutropéniques suite à l'utilisation de drogues cytotoxiques ou suite à une greffe de la moelle osseuse (Fridkin *et al.*, 2002). Il représente aussi une cause significative de mortalité chez les sidéens (Manfredi *et al.*, 2000).

L'agence de santé publique du Canada révèle que les infections nosocomiales à *Pseudomonas sp.* sont graves et souvent mortelles, le taux de létalité étant de 30% chez les populations réceptives. Le genre *Pseudomonas* est répandu dans les hôpitaux du monde entier. Sa fréquence épidémiologique a augmenté au cours des dernières années. Habituellement, les infections nosocomiales à *Pseudomonas* sont liées à des instruments contaminés. Ce type d'infection est à l'origine de 16% des cas de pneumonie hospitalière et de 12% des infections urinaires nosocomiales (fig. 1.1). *Pseudomonas sp.* cause rarement des infections extra hospitalières chez des sujets immunocompétents (Santé Canada, 2001).

1.4 La Fibrose kystique et *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est la cause majeure d'infections pulmonaires chroniques et de décès chez les patients atteints de la fibrose kystique. Il s'agit d'une affection causée par une mutation autosomale récessive du gène nommé « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » ou *cftr*. Cette maladie héréditaire provoque des changements dans l'intégrité du régulateur transmembranaire dont l'expression peut être non-fonctionnelle ou dont la localisation est inadéquate. Le transport des ions chlorures est ainsi interrompu dans les cellules épithéliales, ce qui est à l'origine de l'hypertonicité des sécrétions du poumon (Matsui *et al.*, 1998).

La diminution de l'activité des cils respiratoires empêche l'élimination des particules ainsi que des bactéries se trouvant dans les voies respiratoires. Les sécrétions sont

déshydratées donc visqueuses et difficiles à déloger. De plus, l'activité antimicrobienne du liquide se trouvant à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires est diminuée. Tout cela crée un milieu propice favorisant le développement bactérien. (Matsui *et al.*, 1998).

Lorsqu'il s'agit d'une infection à *P. aeruginosa*, ce pathogène joue un rôle de premier ordre dans la progression des dommages pulmonaires. Il produit des exoprotéases qui activent les métalloprotéinases endogènes et contribuent ainsi à la nécrose des tissus, entraînent une détérioration des poumons et des infections (Hobden, 2002). *P. aeruginosa* possède différents atouts lui permettant le maintien d'une infection chronique. Une fois implanté, ce pathogène persiste après divers traitements aux antibiotiques, crée une déficience de la réponse inflammatoire, adhère aux cellules épithéliales et est capable de s'internaliser en utilisant la protéine non-fonctionnelle CFTR (Pier, 2002).

On remarque une évolution des infections pulmonaires chez les individus atteints de fibrose kystique. Les premières sont provoquées par *Staphyloccocus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Par la suite, *P. aeruginosa* succédera aux premières espèces bactériennes. Quatre-vingt pourcent des patients ayant la fibrose kystique sont infectés par *P. aeruginosa* avant l'âge adulte (FitzSimmons, 1993). On décèle sa présence dès le début de la maladie mais devient le pathogène numéro un après une dizaine d'années. D'autres microorganismes sont présents lors d'infections pulmonaires dont *Burkholderia cepacia* qui tente de s'implanter malgré le fait qu'il est peu présent au début de la maladie. *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* peuvent causer des infections mais à faible taux et ce tout au long de la vie des patients (Gibson *et al.*, 2003).

1.5 La formation de biofilms

L'observation directe d'une grande variété d'habitats naturels révèle que la majorité des microorganismes vivent attachés à des surfaces solides. Ces microorganismes sont capables de s'organiser en communautés structurées que l'on nomme biofilms, lesquels sont hétérogènes, composés de différents genres bactériens et souvent associés à des microorganismes eucaryotes. Auparavant, la grande majorité des organismes étudiés se trouvaient sous forme planctonique tandis que le biofilm comprend des formes sessiles. Ce n'est que depuis les années 1980 que la communauté scientifique a développé un intérêt particulier pour ce type d'organisation cellulaire qu'est le biofilm. Cette structure se retrouve dans une matrice d'exopolysaccharides en contact étroit avec une surface organique ou artificielle. La croissance bactérienne sous forme de biofilm diffère grandement de l'état planctonique, la condition la plus étudiée en laboratoire (Costerton *et al.*, 1995; Hall-Stoodley, Costerton et Stoodley, 2004).

Les cellules étroitement associées constituant un biofilm microbien sont capables de coordonner leur état physiologique et métabolique, à la manière d'un organisme multicellulaire (Caldwell, 2002; Costerton *et al.*, 1995; Shapiro, 1998). Un tel comportement peut offrir plusieurs avantages à une population bactérienne. La matrice extracellulaire est généralement composée de polysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines. La structure ainsi formée contient une multitude de canaux permettant le passage des nutriments. Cette matrice entourant le biofilm confère un certain degré de protection aux bactéries se trouvant au centre du biofilm, particulièrement contre les biocides et les détergents. Les bactéries vivant sous forme de biofilm à l'intérieur d'un hôte humain par l'entremise d'un cathéter contaminé sont moins susceptibles à la réponse du système immunitaire et plus résistantes aux traitements antibiotiques (Costerton *et al.*, 1995; Costerton, Stewart et Greenberg, 1999).

Les biofilms peuvent comprendre une seule ou plusieurs espèces microbiennes se développant sur une gamme de surfaces naturelles et abiotiques. Bien qu'il y ait prédominance de biofilms mixtes dans l'environnement, les biofilms comprenant une

seule espèce se retrouvent souvent dans une multitude d'infections ou à la surface d'implants médicaux (Archibald et Gaynes, 1997; Dickinson et Bisno, 1993). Les biofilms contribuent donc aux infections nosocomiales puisqu'ils se forment sur une grande variété d'implants dont des cathéters (Costerton *et al.*, 1987). *P. aeruginosa* est devenu l'un des microorganismes Gram négatifs le plus étudié pour sa formation de biofilm (O'Toole, Kaplan et Kolter, 2000). Des études suggèrent que la formation de communautés sessiles et leur résistance due aux antibiotiques est la cause d'infections persistantes et chroniques chez les patients atteints de la fibrose kystique (Costerton, Stewart et Greenberg, 1999).

Les bactéries vivant au sein d'un biofilm sont plus résistantes aux antibiotiques que le sont leurs semblables sous forme planctonique. Ceci se traduit en l'établissement d'infections bactériennes chroniques (Finlay et Falkow, 1997). La production d'exopolysaccharides peut protéger les cellules bactériennes contre le système immunitaire de l'hôte (Vuong *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré que la présence d'antibiotiques pouvait augmenter la production d'exopolysaccharides. De plus, les traitements antibiotiques peuvent devenir inefficaces et même dans certains cas promouvoir la formation de biofilms (Rashid *et al.*, 2000; Sailer, Meberg et Young, 2003). *P. aeruginosa* est un bon exemple de la colonisation bactérienne liée à la production d'exopolysaccharide dans les poumons infectés (Lyczak, Cannon et Pier, 2002).

Le transfert de gènes est aussi favorisé au sein du biofilm (Ghigo, 2001; Molin et Tolker-Nielsen, 2003), permettant ainsi l'échange rapide et efficace de gènes de résistance aux antibiotiques, ayant pour conséquence de rendre très difficile le combat des infections dues aux biofilms. La possibilité de former des biofilms confère à *P. aeruginosa* un avantage lors de l'infection et de la persistance dans l'hôte. De plus, elle contribue aux échecs des traitements antibiotiques (Fabian, 2000).

1.6 La résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est une bactérie naturellement résistante aux antibiotiques conventionnels. Ceci est en partie dû à la faible perméabilité de sa membrane externe (Wilkinson, 1968). Dans les hôpitaux, plusieurs cas ont déjà été documentés au sujet de souches de *P. aeruginosa* résistantes à de multiples antibiotiques (Fabian, 2000). Les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques sont susceptibles de causer une hausse de mortalité, des hospitalisations prolongées ainsi qu'une augmentation des coûts engendrés dans la santé (Carmeli *et al.*, 1999b). La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques est un problème grandissant (Basustaoglu *et al.*, 1995; Burwen, Banerjee et Gaynes, 1994; Obritsch *et al.*, 2005; Shahid et Malik, 2005; Troillet, Samore et Carmeli, 1997) et son émergence survient fréquemment lors des thérapies (Carmeli *et al.*, 1999a; Fink *et al.*, 1994; Manian *et al.*, 1996; Milatovic et Braveny, 1987; Pechere et Vladoianu, 1992; Quinn *et al.*, 1986).

Il existe un nombre limité d'agents antimicrobiens ayant une activité contre *P. aeruginosa* incluant les pénicillines et céphalosporines, les carbapenems et fluoroquinolones, particulièrement le ciprofloxacin. Les aminoglycosides sont utilisés fréquemment en combinaison avec un autre antibiotique pour le traitement d'infections sérieuses à *Pseudomonas*. Selon l'Agence de santé publique du Canada, le traitement de première intervention privilégié est la combinaison d'une aminoglycoside avec une bêta-lactamine (Santé Canada, 2001). Parues aux États-Unis dans le « National nosocomial infections surveillance » (National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report), des données ont montré une augmentation de la résistance aux antibiotiques communément utilisés dans les hôpitaux. L'imipenème, le ciprofloxacin et la ceftazidime ont vu la résistance accroître par 15%, 9% et 20% respectivement entre 1998-2002 et en 2003 (NNIS System Report, 2004). Pour chacun de ces antibiotiques, l'émergence de la résistance lors des thérapies est reconnue comme une cause d'échec au traitement. De plus, il existe des différences parmi les antibiotiques utilisés, certains favorisant l'émergence de la résistance. Le ceftazidime a été associé à un risque plutôt faible alors que l'utilisation de l'imipenème représente un risque élevé de résistance (Carmeli *et al.*,

1999a). Il existe un autre genre de risque tout aussi élevé chez des patients exposés à des antimicrobiens à large spectre dont la vancomycine (Harris *et al.*, 2002). L'élimination de la flore naturelle de l'hôte peut faciliter l'attachement de *P. aeruginosa* à l'épithélium oral et respiratoire. L'implantation d'un programme d'utilisation des antibiotiques semble nécessaire pour réduire ce genre d'infections (Hughes *et al.*, 2004).

Il n'existe aucune immunisation contre *P. aeruginosa* qui est la source de nombreux cas d'infections et dont le nombre de souches multirésistantes est en hausse (Santé Canada, 2001). Il devient urgent d'identifier de nouvelles thérapies pour contrer ce phénomène de manière à ne pas développer de résistance naturelle. Plusieurs molécules agissant directement sur la biosynthèse des facteurs de virulence sont l'objet d'études diverses. Cibler l'inhibition du processus d'infection contrairement aux fonctions essentielles nécessaires à la viabilité bactérienne pourrait diminuer la pression sélective des antibiotiques causant le développement de la résistance (Hentzer et Givskov, 2003).

1.7 Les facteurs de virulence

La pathogénicité est une propriété multifactorielle dont l'intensité du pouvoir pathogène dépend des facteurs de virulence. Elle est estimée par sa capacité à adhérer, coloniser ou envahir les tissus de l'hôte et de provoquer la maladie. De plus le microorganisme doit être capable de se multiplier et d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Finalement il doit posséder la capacité mécanique, chimique ou moléculaire de nuire à l'hôte (Prescott, Harley et Klein, 1995).

L'environnement dans lequel se retrouve un pathogène est complexe et change constamment. Les facteurs de virulence produits *in vivo* peuvent donc être absent *in vitro* si les conditions de croissance ne favorisent pas leur production. La contribution des facteurs de virulence à la pathogénicité des microorganismes a été reconnue lors du siècle dernier. Un des mécanismes utilisé par *P. aeruginosa* pour combattre le système de défense de l'hôte est de produire une abondante quantité de facteurs extracellulaires incluant des protéases, des toxines, des hémolysines ainsi que la pyocyanine. Ces facteurs

ont été associés à la virulence de *P. aeruginosa* lors d'essais dans des modèles animaux, des études *in vitro* ainsi que des études cliniques (Blackwood *et al.*, 1983; de Kievit et Iglewski, 2000; Jaffar-Bandjee *et al.*, 1995).

La variation génétique a été étudiée parmi un répertoire de 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ayant été isolées de diverses infections humaines ainsi que de différentes sources environnementales (Wolfgang *et al.*, 2003). Il a été observé que le génome de *P. aeruginosa* est hautement conservé, incluant la presque totalité des facteurs de virulence connus. Les produits des gènes associés à la virulence de *P. aeruginosa* sont presque exclusivement retrouvés dans la catégorie des facteurs sécrétés. Des gènes additionnels reliés à l'expression de la virulence sont associés à la motilité et l'attachement, la sécrétion et l'exportation de protéines ainsi qu'à des régulateurs transcriptionnels. L'étude de ces 267 gènes jouant un rôle direct ou ceux étant prédits de jouer un rôle direct dans la virulence de *P. aeruginosa* indique un haut niveau de conservation, plus de 97% (Wolfgang *et al.*, 2003). Les gènes associés à la virulence sont présents dans toutes les souches indépendamment de la source de l'infection. La conservation des gènes de virulence dans les différentes souches cliniques montre que la capacité du pathogène opportuniste de causer des infections repose sur des mécanismes de pathogénicité hautement conservés. Cependant, chaque infection peut être influencée par des caractéristiques fournies par quelques individus ou un petit nombre de gènes de virulence spécifiques à la souche. La conservation de ces mêmes gènes s'étend même jusqu'aux isolats environnementaux. La sélection pour le maintient des traits de virulence semble exister dans l'environnement. Il serait donc probable que les souches environnementales analysées dans cette étude soient capable de causer des infections, malgré la faible probabilité pour *P. aeruginosa* de rencontrer un hôte humain (Wolfgang *et al.*, 2003). Des analyses phylogénétiques de gènes spécifiques à certaines souches n'ont révélé aucune corrélation entre leur contenu génétique et le type d'infection. Des groupes de gènes spécifiques retrouvés dans le génome de *P. aeruginosa*, nommés segments variables, semblent être des sites préférés pour l'intégration de nouveau matériel génétique. L'acquisition de nouveau matériel par transfert horizontal peut augmenter la colonisation et la survie de *P. aeruginosa* dans différents environnements hôtes

(Wolfgang *et al.*, 2003).

Les facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* sont variés et peuvent être soit associés à la cellule, soit être sécrétés dans l'espace extracellulaire. D'ailleurs il est important de réaliser que la pathogénicité n'est pas reliée à un seul facteur, mais est bien due à l'interaction de différents facteurs. Elle permet la colonisation et la formation de biofilm, la nécrose des tissus, l'invasion et la dissémination dans le système vasculaire, tout comme l'activation locale et systémique de la réponse inflammatoire (Van Delden, 2004).

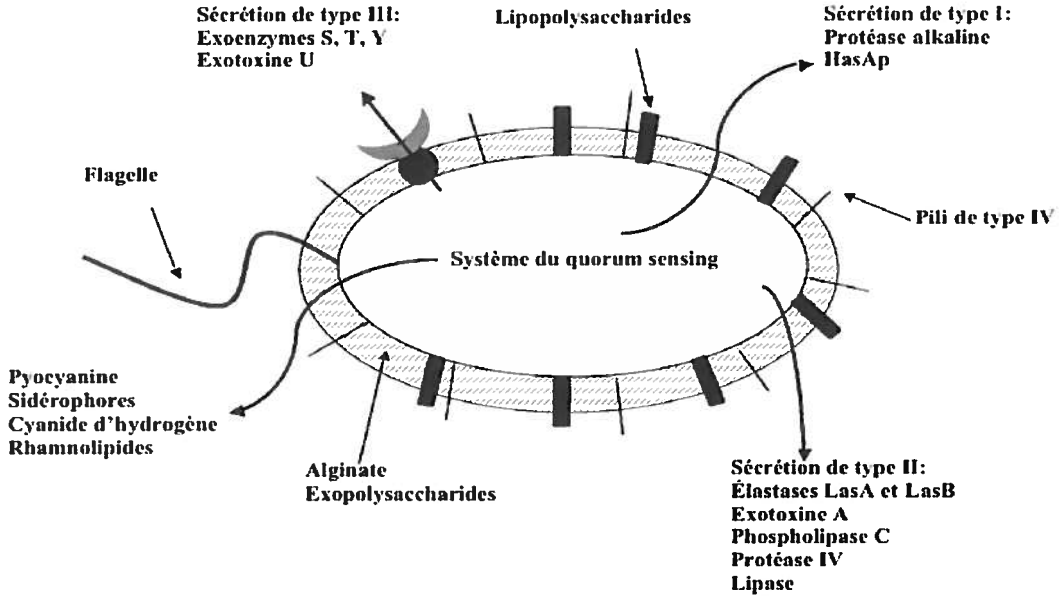


Figure 1.2 Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*. Les composantes associées à la cellule bactérienne sont le flagelle, le pili de type IV, les adhésines et les lipopolysaccharides. Les facteurs de virulence extracellulaires sont les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A, la phospholipase C, la protéase IV, la lipase, les exoenzymes S, T et Y, l'exotoxine U, l'aginate et les exopolysaccharides, la pyocyanine, les sidérophores, l'acide cyanhydrique et les rhamnolipides. L'appareil de sécrétion de type III sert à injecter des protéines dans les cellules eucaryotes. Le quorum sensing régule la production de plusieurs facteurs de virulence extracellulaires. D'après Van Delden (2004).

1.7.1 Les facteurs de virulences associés à la cellule bactérienne

Les facteurs de virulence associés à la cellule bactérienne peuvent promouvoir l'adhésion (fig. 1.2). *P. aeruginosa* utilise différentes adhésines afin d'initier un premier contact à la surface d'une cellule épithéliale. Il s'agit des facteurs d'adhésion (Van Delden, 2004).

1.7.1.1 OpfR

Les interactions entre bactéries et récepteurs de surface cellulaire reposent sur six fibronectines. Chez *P. fluorescens*, OprF, une protéine majeure de la membrane externe, semble contribuer directement à l'adhésion aux cellules épithéliales (Azghani *et al.*, 2002). On retrouve aussi OprF chez *P. aeruginosa* PAO1 et PA14 [www.pseudomonas.com].

1.7.1.2 Le pili de type IV

La capacité de *P. aeruginosa* non-mucoïde à s'attacher aux cellules épithéliales est due à 90% aux pili de type IV (de Bentzmann *et al.*, 1996; Hahn, 1997). À la surface des pili, les lectines spécifiques PA-IL et PA-IIL agissent en tant que ligands réagissant avec des séquences complémentaires de la cellule hôte dont les glycosphingolipides des érythrocytes, pouvant permettre la dispersion de l'infection dans les tissus (Gilboa-Garber *et al.*, 1994). Chez *P. aeruginosa*, ces lectines sont contrôlées par le quorum sensing, lequel contrôle la production de nombreux autres facteurs de virulence extracellulaires (Van Delden et Iglewski, 1998; Winzer *et al.*, 2000).

1.7.1.3 Le flagelle

Le flagelle, responsable de la motilité, est constitué majoritairement de la flagelline. Cette protéine semble agir en tant qu'adhésine, lui permettant de se lier à la mucine (Feldman *et al.*, 1998; Scharfman *et al.*, 2001). Il s'agit du principal composé du mucus, un gel visqueux retrouvé à la surface des cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires. La fonction première de la mucine est de retenir et évacuer les particules inhalées à l'aide de l'appareil ciliaire. Dans le cas de maladies comme la fibrose kystique, la fonction mucociliaire est détériorée. La mucine facilite alors la colonisation des voies respiratoires et joue un rôle important dans la pathogénicité (Ramphal, Arora et Ritchings, 1996). Le flagelle est aussi un composant bactérien pouvant permettre l'interaction initiale surface-cellule nécessaire à la colonisation, une étape essentielle au développement de biofilm

(O'Toole et Kolter, 1998).

1.7.1.4 Les lipopolysaccharides

La plupart des bactéries Gram négatives ont dans la membrane externe de leur paroi des lipopolysaccharides ou LPS qui, dans certaines circonstances, sont toxiques pour l'hôte (Rocchetta, Burrows et Lam, 1999). Le LPS est associé à l'attachement de *P. aeruginosa* avec divers composants de son environnement, biotique et abiotique. Il a été suggéré que le LPS influence l'hydrophobicité des surfaces (Makin et Beveridge, 1996). Des modifications créées par les groupes phosphoryles composant le LPS provoquent des changements phénotypiques affectant l'interaction des cellules bactériennes à diverses surfaces. Ce phénomène été observés lors de la formation et de la maturation de biofilms. Ces modifications sont réversibles lorsque les cellules sont retirées du biofilm et cultivées sous forme planctonique (Beveridge *et al.*, 1997). Le LPS pourrait aussi agir en tant que ligand lors de l'attachement et de l'entrée à l'intérieur de cellules eucaryotes (Zaidi *et al.*, 1996).

1.7.2 Les facteurs de virulence extracellulaires

Suite à la première étape de colonisation, *P. aeruginosa* sécrète des protéines causant des dommages tissulaires, l'invasion des canaux sanguins et la dissémination. Des mutants déficients pour la production de ces facteurs ont été testés individuellement dans des études *in vivo*. Ils ont montré lesquels étaient essentiels à la virulence de *P. aeruginosa* (Nicas et Iglewski, 1985).

Trois systèmes de sécrétion existent chez *P. aeruginosa*. Le type I est appelé système ABC. Trois protéines sont sécrétées par ce système : la protéase alcaline, la protéine HasAp (Letoffe, Redeker et Wandersman, 1998) et la protéine AprX (Duong *et al.*, 2001). La majorité des facteurs de virulence sont sécrétés par le système II soit les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A, les lipases, la phospholipase C et la protéase IV (Filloux, Michel et Bally, 1998). Ces produits sont cytotoxiques. Ils peuvent avoir un

effet sur différents tissus éloignés du site d'infection. Il a été suggéré que le système de sécrétion de type II est régulé par le quorum sensing (Chapon-Herve *et al.*, 1997). Finalement, des produits non cytotoxiques chez les cellules eucaryotes sont sécrétés par le système III. Ces produits requièrent un contact étroit avec la cible cellulaire afin d'exercer leur toxicité au site d'infection. Il s'agit des exoenzymes S, T, Y et de l'exotoxine U. Ce système utilise un appareil de sécrétion et translocation pour injecter, lors d'un contact étroit, la protéine effectrice directement dans le cytoplasme de la cellule cible (fig. 1.2) (Barbieri, 2000).

1.7.2.1 La protéase alcaline

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les protéines en acides aminés. La protéase alcaline est une métalloprotéase dont l'expression est contrôlée par le système de quorum sensing de *P. aeruginosa* (Gambello, Kaye et Iglewski, 1993). Elle est la seule exoprotéase sécrétée par le système de sécrétion de type I. Elle est produite *in vitro* par des isolats provenant de patients souffrant de la fibrose kystique (Coin *et al.*, 1997; Louis, Sorlier et Wallach, 1998). La protéase alcaline a aussi été détectée dans les tissus de la cornée lors d'une infection à *P. aeruginosa* (kératite) (Kernacki et al., 1995) et lors de bactériémies (Hirakata *et al.*, 1995). Il semble qu'un des rôles d'une telle protéase bactérienne serait d'inhiber la réponse immune locale permettant ainsi le développement d'un environnement approprié à la colonisation.

1.7.2.2 Les élastases LasA et LasB

Les élastases dégradent ou inactivent d'importantes protéines de divers tissus biologiques et des composants du système immunitaire, dont les immunoglobulines (Doring, Obernesser et Botzenhart, 1981; Heck *et al.*, 1990). La capacité de *P. aeruginosa* de détruire l'élastine est vue comme un déterminant majeur de la virulence lors d'une infection aigue. L'élastine se trouve en grande proportion dans les tissus pulmonaires et est responsable de l'expansion du poumon et de sa contraction. Elle est une importante composante des vaisseaux sanguins (Galloway, 1991).

La production de l'élastase LasB est dépendante du contrôle du quorum sensing (Van Delden et Iglewski, 1998). *In vivo*, l'activité de LasB n'est pas très bien connue mais *in vitro*, on dénote la dégradation du collagène et de l'élastine, soit les protéines importantes pour l'élasticité du poumon (Heck, Morihara et Abrahamson, 1986; Heck *et al.*, 1986). L'élastase contribue à la protéolyse des cellules de l'immunité (Holder et Wheeler, 1984), des inhibiteurs sériques (Morihara *et al.*, 1984) et de certains composants du système du complément (Schultz et Miller, 1974). L'élastase est l'exoprotéase majeure de *P. aeruginosa* et de loin la plus efficace (Galloway, 1991). Elle est sécrétée par le système de sécrétion de type II.

La staphylolysine ou protéine LasA de *P. aeruginosa* est une protéase dont la transcription du gène *lasA* est hautement régulée par le quorum sensing. La staphylolysine est un important facteur de virulence lors d'une infection oculaire à *P. aeruginosa* (Estrellas, Alionte et Hobden, 2000). *In vitro*, LasA permet la lyse des cellules de *S. aureus* en clivant les ponts polyglycines du petidoglycan (Brito *et al.*, 1989; Lache *et al.*, 1969). En synergie avec LasB, cette exoprotéase provoque la dégradation de l'élastine mais lorsque seule, LasA reste inactive (Kessler *et al.*, 1997). LasA clive le lien Gly-Ala dans la séquence Gly-Gly-Ala de l'élastine, permettant la dégradation par l'élastase LasB (Kessler *et al.*, 1997). L'activité combinée de LasA et LasB est responsable de l'effet élastolytique abîmant l'élastine des tissus pulmonaires. Cette combinaison cause ainsi des hémorragies associées aux infections par *P. aeruginosa* (Galloway, 1991).

1.7.2.3 Les rhamnolipides

P. aeruginosa produit deux hémolysines, la phospholipase C et les rhamnolipides. Ils sont soupçonnés d'agir en synergie et de contribuer à l'invasion tissulaire par leur effet cytotoxique. Les rhamnolipides sont des biosurfactants de type glycolipidiques de faible poids moléculaire contenant une ou deux molécules de rhamnose reliées à un ou deux acides 3-hydroxyalcanoïques reliés entre eux par des chaînes aliphatiques. Ces biosurfactants ont une structure semblable aux détergents, abaissent la tension de surface

des liquides et sont soupçonnés de dissoudre le surfactant des poumons, les phospholipides, et de les rendre accessibles à la phospholipase C (Liu, 1974). La régulation génétique de la production des rhamnolipides est dépendante de la densité cellulaire et contrôlée par le système de quorum sensing (Maier et Soberon-Chavez, 2000). Les rhamnolipides sont retrouvés en grande concentration dans le sputum de patients ayant la fibrose kystique et dont les bronches sont colonisées par *P. aeruginosa* (Kownatzki, Tummler et Doring, 1987). La production de rhamnolipides permet l'inhibition du transport mucocilliaire et des fonctions ciliaires de l'épithélium respiratoire. L'absence de ces fonctions permet le maintien de la population bactérienne dans le poumon (Read *et al.*, 1992). Les rhamnolipides inhibent aussi la réponse phagocytaire des macrophages (McClure et Schiller, 1992). Ils agissent comme hémolysines extracellulaires thermostables, capables de faire éclater les globules rouges et de libérer l'hémoglobine (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980).

Les rhamnolipides semblent jouer un rôle important lors du développement de communautés bactériennes et particulièrement dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Davey, Caiazza et O'Toole, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Un mutant *rhlA* est incapable de produire des rhamnolipides. Il est aussi incapable de maintenir l'architecture des canaux à l'intérieur des biofilms. De plus, les rhamnolipides pourraient prévenir la colonisation d'un biofilm de *P. aeruginosa* par d'autres espèces bactériennes (Davey, Caiazza et O'Toole, 2003).

1.7.2.4 La pyocyanine

P. aeruginosa synthétise un composé caractéristique bleu, soluble dans le chloroforme, que l'on nomme pyocyanine. Cette molécule fait partie de la famille des composés tricycliques nommés phénazines (Frank et Demoss, 1959). Il a été démontré que ce composé inhibe la respiration cellulaire chez les mammifères (Stewart-Tull et Armstrong, 1972), empêche le battement ciliaire (Wilson *et al.*, 1987), inhibe la croissance des cellules épidermiques (Cruickshank et Lowbury, 1953) ainsi que l'activité de catalase dans les cellules épithéliales pulmonaires chez l'humain (O'Malley *et al.*, 2003). Ce

chromophore inactive l'inhibiteur de protéase α1PI3 au site d'infection protégeant ainsi les protéases de *P. aeruginosa.* De plus, il a été démontré que la dysfonction des cellules épithéliales du nez chez les patients atteints de la fibrose kystique est due à l'importante concentration de pyocyanine présente dans le sputum. (Ratledge et Dover, 2000).

La pyocyanine existe sous forme oxydée ou réduite, la deuxième étant un radical libre réagissant rapidement avec l'oxygène moléculaire. Cette oxydation permet la formation de superoxide (O^{2-}), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou, en présence d'un catalyseur de fer, forme un radical hydroxy (HO•). Ces espèces très réactives, présentes en trop grande concentration dans l'organisme, sont toxiques (Fridovich, 1978). La pyocyanine possède une activité antimicrobienne contre une variété de microorganisme, permettant à *P. aeruginosa* de bénéficier de l'élimination de ses compétiteurs (Baron et Rowe, 1981). Il a été démontré que la synthèse de la pyocyanine est régulée en partie par le quorum sensing (Latifi *et al.*, 1995) et plus particulièrement par la molécule signal PQS (fig. 1.8) et l'expression de *pqsE* (Déziel *et al.*, travaux non publiés).

1.7.2.5 Les sidérophores

Tous les microorganismes nécessitent du fer permettant de maintenir actif de nombreuses enzymes ainsi que les cytochromes. *P. aeruginosa* n'échappe pas à la règle. Comme la plupart des bactéries Gram négatives aérobies, il est confronté au problème d'insolubilité des ions ferriques Fe^{3+} rendant la capture du fer difficile. Il doit donc excréter des molécules chélatant le fer(III), les sidérophores. (Prescott, Harley et Klein, 1995). Ce sont ces protéines qui vont permettre au microorganisme d'obtenir le fer de l'hôte à partir de l'hémoglobine, des transferrines, des ferritines ainsi que d'autres protéines (Ratledge et Dover, 2000).

P. aeruginosa sécrète deux types de sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline dans des conditions limitantes en fer. Ces molécules de transport du fer complexent les ions ferriques et les fournissent à la cellule bactérienne à l'aide de récepteurs cellulaires spécifiques (Beare *et al.*, 2003; Lamont *et al.*, 2002). La pyoverdine et la pyochéline sont

requises pour la pleine virulence de *P. aeruginosa* dans des modèles animaux (Meyer *et al.*, 1996; Takase *et al.*, 2000).

Remarquable par sa couleur fluorescente, la pyoverdine capte et transporte le fer. Dans les poumons des patients atteints de fibrose kystique, ce chromophore est produit *in vivo* lors de la colonisation (Haas, Murphy et Castignetti, 1991). La présence de la pyoverdine est importante pour l'acquisition du fer dans le poumon et favorise la croissance bactérienne. Une fois que la pyoverdine est complexée au fer, la présence de ce complexe dans le milieu extracellulaire est un régulateur positif de la transcription d'autres facteurs de virulence dont l'exotoxine A ainsi qu'une endoprotéase (Lamont *et al.*, 2002). La pyocheline agit elle aussi comme capteur de fer. Cette protéine, une fois complexée au fer, est responsable de la production de radicaux hydroxyles cytotoxiques, soit le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes à partir des produits des neutrophiles. La pyocheline contribue ainsi à la destruction des cellules épithéliales des poumons (Britigan *et al.*, 1992).

1.7.2.6 L'alginate

L'alginate est un exopolysaccharide produit par *P. aeruginosa*. La surproduction de l'alginate permet à la bactérie de combattre les agressions extérieures. La croissance de *P. aeruginosa* à l'intérieur d'une matrice composée d'alginate donne la résistance à plusieurs antibiotiques dont des aminoglycosides, des β–lactames, des fluoroquinolones ainsi qu'à des désinfectants (Govan et Deretic, 1996). La résistance peut être associée à différents déterminants dont la croissance lente, la difficulté d'infiltrer la barrière d'alginate ainsi que la production de β–lactamases (Hoiby *et al.*, 2001). Une infection chronique à *P. aeruginosa* se traduit par le développement d'un biofilm. Celui-ci est créé par la formation d'une capsule du polysaccharide alginate, à la surface de la bactérie (Pedersen *et al.*, 1992; Evans et Linker, 1973).

Lors de la colonisation initiale de *P. aeruginosa* dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique, une thérapie antibiotique agressive peut faire disparaître l'infection.

Cependant, lorsqu'il y a conversion de la morphologie cellulaire des bactéries isolées du sputum en phénotype mucoïde, il est impossible de les enrayer (Frederiksen, Koch et Hoiby, 1997). Dans le cas de patients souffrant de fibrose kystique, il y a sélection de mutants mucoïdes. Plus de 90% des souches de *P. aeruginosa* isolées de poumons de patients atteints de fibrose kystique sont de phénotype mucoïdes (Govan et Deretic, 1996; Rowen et Deretic, 2000).

1.8 Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) permet de réguler l'expression des gènes en réponse à la densité cellulaire. Cette régulation permet aux cellules individuelles d'agir de manière coordonnée et en synergie avec la communauté. Ce genre de communication cellulaire peut servir à l'instauration d'une dynamique de croissance et à l'utilisation des ressources (Fuqua, Winans et Greenberg, 1994). Le QS est un phénomène retrouvé chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Il est dirigé par la production de phéromones de faible poids moléculaire, que l'on appelle autoinducteurs. La concentration de ces phéromones permet aux cellules bactériennes de détecter la densité de leur population dans un environnement précis. Lorsque la densité bactérienne est suffisante, c'est-à-dire qu'une certaine concentration en phéromones est atteinte, il pourra y avoir initiation d'une réponse concertée de la population (Fuqua, Winans et Greenberg, 1994).

Le premier système du genre a été décrit chez *Vibrio fischeri* (Nealson et Hastings, 1979), une espèce symbiotique fournissant sa lumière à des espèces marines eucaryotiques. L'émission de la lumière dépend de la transcription de l'opéron luciférase. Elle survient lorsque la densité de la population est suffisante pour produire l'accumulation d'un autoinducteur. La biosynthèse de l'autoinducteur est contrôlée par le gène *luxI*. Au-dessus d'un certain seuil de concentration, l'autoinducteur se lie à la protéine LuxR. Une fois le complexe formé, il ira se lier au promoteur de la luciférase à un site spécifique nommé boîte *lux*. Bien qu'initialement considéré pour être un système spécialisé chez *V. fischeri*, des travaux ont révélé des systèmes homologues ayant des fonctions biologiques diverses. Ceci inclut *Erwinia carotovora*, un pathogène de plante

ayant un système de QS séparé. Une partie sert à l'expression d'enzymes nécessaires à l'attaque de l'hôte (Jones *et al.*, 1993; Pirhonen *et al.*, 1993) et l'autre à la production d'antibiotiques (Bainton *et al.*, 1992). Chez *Agrobacterium tumefaciens*, un autre pathogène des plantes, les homologues *luxI/R* (*traI/R*) sont localisés sur un plasmide qui active le transfert entre bactéries pour la conjugaison (Fuqua et Winans, 1994). La nature des autoinducteurs varie selon les systèmes de QS. Le trait commun est l'activation transcriptionnelle ainsi que la répression d'un régulon de gènes contrôlés par le QS lorsque le seuil ou la concentration minimale d'un autoinducteur spécifique est atteint. Les signaux extracellulaires agissants sur le système de quorum sensing des bactéries à Gram négatif sont les N-acyl-L-homosérines lactones (fig. 1.3) (Fuqua, Parsek et Greenberg, 2001).

Certains pathogènes peuvent réguler la production de leurs facteurs de virulence. Il existe différents mécanismes complexes de transduction de signal en réponse à des conditions environnementales (Betley, Miller et Mekalanos, 1986; Finlay et Falkow, 1989). La production de facteurs de virulence extracellulaires par un petit nombre de bactéries peu mener à une réponse efficace de l'hôte en neutralisant les composés rejetés par les microorganismes. Cependant, il peut y avoir l'expression coordonnée des gènes de virulence par une population bactérienne entière lorsque qu'une certaine densité cellulaire est atteinte. Dans ce cas, il pourra y avoir sécrétion de facteurs extracellulaires seulement lorsqu'ils pourront êtres produits en concentration suffisante pour contrer les défenses de l'hôte. Ceci provoque un changement de l'équilibre entre les défenses de l'hôte et les toxines bactériennes. L'invasion du système circulatoire et la dissémination peut ainsi avoir lieu (Van Delden et Iglewski, 1998).

Les résultats d'études phylogénétiques indiquent que les systèmes de quorum sensing sont anciens chez plusieurs espèces bactériennes. Ceci suggère que le mécanisme de QS a été établi assez tôt dans l'évolution des bactéries. De manière générale, les gènes associés au QS sont contigus sur le chromosome. Les composants du complexe autoinducteur/régulateur transcriptionnel demeurent fonctionnels dans leur association, ce qui laisse supposer qu'ils ont une évolution commune (Lerat et Moran, 2004).

1.8.1 Le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le quorum sensing régule différents événements chez *P. aeruginosa* dont la formation de biofilms, la production de facteurs de virulence et de métabolites secondaires, tout comme l'adaptation et la survie en phase stationnaire (Davies *et al.*, 1998).

P. aeruginosa produit et répond à l'émission de signaux intercellulaires et d'autoinducteurs en coordonnant l'expression de gènes de virulence (Rumbaugh, Griswold et Hamood, 2000; Smith et Iglewski, 2003). La capacité de coordonner l'expression de ses gènes est avantageuse. Elle permet à *P. aeruginosa* une attaque concertée lorsqu'il y a suffisamment de cellules pour submerger les défenses de l'hôte (de Kievit et Iglewski, 2000).

P. aeruginosa est l'un des modèles les mieux étudiés pour la production des acyl homosérines lactones (AHL) (Pesci *et al.*, 1999). Chez *P. aeruginosa*, il existe deux systèmes de quorum sensing, las et rhl. Chacun de ces systèmes comprend un régulateur transcriptionnel, LasR et RhlR, ainsi qu'une AHL synthase, LasI et RhlI (Pesci *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1995). Les produits des gènes *lasI* et *rhlI*, sont les autoinducteurs, respectivement le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C_{12}-HSL) ainsi que le N-butyroyl-L-homosérine lactone (C_4-HSL) (fig. 1.3) (Pearson *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1995). Le système las régule le système rhl en formant une cascade d'activation transcriptionnelle (fig. 1.7) (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). La paire d'autoinducteurs synthase et de régulateurs transcriptionnels LasRI et RhlRI dirigent ainsi l'expression de plusieurs gènes, incluant des facteurs de virulence, en réponse à l'augmentation de la concentration d'AHL spécifiques, les oxo-C12-HSL et C4-HSL (Pesci *et al.*, 1999).

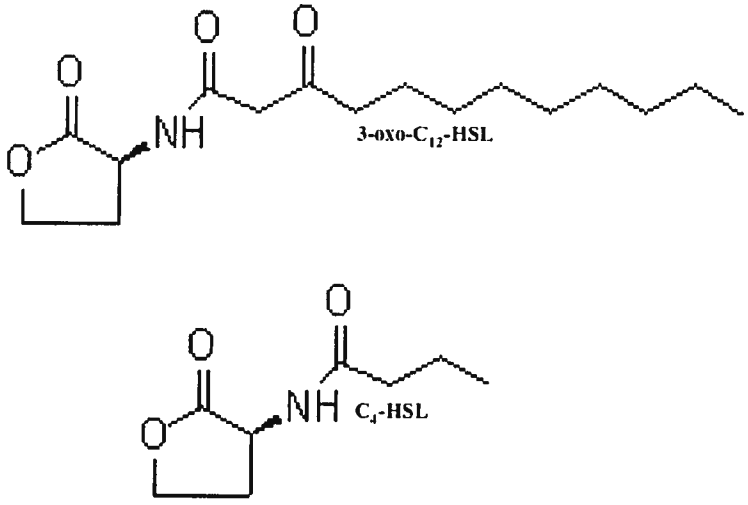


Figure 1.3 Les acylhomosérines lactones chez *P. aeruginosa*. Les autoinducteurs des systèmes *las* et *rhl*, le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C_{12}-HSL) et le N-butyroyl-L-homosérine lactone (C_4-HSL) respectivement. D'après Pearson *et al.* (1994).

Les deux systèmes de quorum sensing sont hautement spécifiques. L'autoinducteur d'un système est incapable d'activer l'activateur transcriptionnel de l'autre système (Latifi *et al.*, 1995; Pearson, Pesci et Iglewski, 1997) mais l'un n'est pas complètement indépendant de l'autre. Le complexe LasR/3-oxo-C_{12}-HSL active l'expression de *rhlR* (fig. 1.7). Le système *lasRI* se retrouve donc au-dessus du système *rhlRI* dans la hiérarchie du quorum sensing (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997).

À basse densité cellulaire, les autoinducteurs sont synthétisés à un niveau très bas. Les autoinducteurs diffusent ou sont transportés (Pearson, Van Delden et Iglewski, 1999) dans l'environnement immédiat de la bactérie où le signal est dilué. La conséquence en est l'absence de transcription de gènes. Avec l'augmentation de la densité cellulaire, les deux autoinducteurs s'accumulent dans le milieu jusqu'à ce que leur concentration intracellulaire atteigne un certain seuil. Une fois la concentration critique atteinte, les autoinducteurs 3-oxo-C_{12}-HSL et C_4-HSL vont se lier à leur protéine correspondante, LasR et RhlR (Fuqua, Winans et Greenberg, 1996). Le complexe régulateur transcriptionnel-autoinducteur va se fixer à une séquence d'ADN spécifique en amont du gène cible, permettant la transcription (Stevens, Dolan et Greenberg, 1994; Stevens et Greenberg, 1997). Ce système nous permet de croire que les cellules bactériennes

peuvent communiquer entre elles (signalisation cellulaire) (fig. 1.8), évaluer la concentration des cellules environnantes (quorum sensing) et agir de manière coordonnée en exprimant spécifiquement différents gènes en tant que population et non plus comme cellules individuelles (Van Delden et Iglewski, 1998).

Il a été reconnu que *P. aeruginosa* produit un signal intercellulaire distinct des AHL (Pesci *et al.*, 1999). Unique à *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2003), un troisième signal intercellulaire a été isolé, le 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline que l'on nomme aussi le « Pseudomonas Quinolone Signal » ou PQS (Pesci *et al.*, 1999). Le PQS s'insère dans la hiérarchie du quorum sensing de *P. aeruginosa* en reliant la régulation des systèmes las et rhl (fig. 1.7) (McKnight, Iglewski et Pesci, 2000). Il a été découvert que la production maximale du PQS correspond à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (Lépine *et al.*, 2003). Ceci supporte l'hypothèse que le PQS est un signal de régulation secondaire pour un sous-groupe de gènes contrôlés par le QS (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2003). Malgré le fait que le PQS n'ait pas d'activité antibiotique (Pesci *et al.*, 1999), il appartient à une famille peu caractérisée de composés antimicrobiens, les « composés pyo ». Ces composés sont des dérivés 4-hydroxy-2-alkylquinolines ou HAQ (Hays *et al.*, 1945; Lépine *et al.*, 2004).

1.8.2 La biosynthèse des 4-hydroxy-2-alkylquinolines

Jusqu'à récemment, l'analyse des HAQ était problématique et indirecte. Le PQS était quantifié par analyse densitométrique à partir de plaques chromatographiques sur couche minces (Calfee, Coleman et Pesci, 2001; D'Argenio *et al.*, 2002), par essais biologiques indirects détectant l'expression d'un rapporteur *lasB'-lacZ* suite à l'exposition au PQS (Pesci *et al.*, 1999) et par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse à capture d'électrons (Taylor *et al.*, 1995). Lépine *et al.* ont développé une méthode d'analyse des HAQ par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) (Lépine *et al.*, 2003) qui a permis de quantifier et détecter différents HAQ chez *P. aeruginosa* dont plusieurs n'ayant jamais été décrit auparavant (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004).

Calfee *et al* (2001). ont découvert à l'aide d'acide anthranilique (AA) marqué au carbone 14 que le AA est un précurseur du PQS. Cependant, le PQS ne représentait que 12% des composés nouvellement synthétisés et marqués au carbone 14, indiquant qu'il pouvait y avoir d'autres composés additionnels dérivés de l'AA (Calfee, Coleman et Pesci, 2001). Sachant que la biosynthèse du 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), un des premiers HAQ décrits par Hays, se fait à partir de l'acide anthranilique se liant à une céto acide (Ritter et Luckner, 1971), Déziel *et al.* ont émis l'hypothèse que l'acide anthranilique est le précurseur des HAQ. Suite à l'addition d'acide anthranilique tetradeutéré (AA-d_4) à une culture de *P. aeruginosa* PA14, l'analyse du surnageant des cultures en LC/MS a révélé que les ions caract.ristiques des HAQ étaient augmentés d'une valeur de 4 Daltons, démontrant clairement que l'acide anthranilique est le précurseur commun (Déziel *et al.*, 2004).

Les spectres de masse des composés correspondants aux nombreux pics chromatographiques observés permettent de conclure à la présence de cinq séries distinctes de HAQ ayant une 4-hydroxyquinoline comme structure commune. Dans chaque série, la chaîne alkyle en position 2 varie en longueur. Les congénères les plus abondants ont une chaîne alkyle avec un nombre impair de carbone, principalement 7 ou 9 (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004). Dans la série A, le C_7 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et le C_9 (HNQ) sont connus depuis 1952 (Wells, 1952). La série B possède un groupe hydroxyle supplémentaire en position 3. Le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, isolé et identifié en 1959 (Takeda, 1959) est caractérisé et nommé PQS en 1999 (Pesci *et al.*, 1999). La série C possède un groupe N-oxide. Les congénères N-oxides C_7, C_9 et C_{11} sont déjà connus. Ils avaient été isolés pour leur propriétés antagonistes de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine (Cornforth et James, 1956; Lightbown, 1954; Sureau *et al.*, 1948). L'activité antibactérienne du congénère C_7 4-hydroxy-2-nonylquinoline N-oxide (HQNO) a été démontrée contre *S. aureus* et *Bacillus subtilis* (Déziel *et al.*, 2004; Machan *et al.*, 1992). HQNO est aussi largement utilisé comme inhibiteur du cytochrome des cellules procaryotes et eucaryotes (Lightbown et Jackson, 1956). Enfin, il peut réguler la virulence de *Vibrio cholerae* (Häse et Mekalanos, 1999). Les séries D et E possèdent une chaîne alkyl insaturée, la

série E étant similaire à la série C N-oxide, la série D étant similaire à la série A (fig. 1.4) (Déziel *et al.*, 2004).

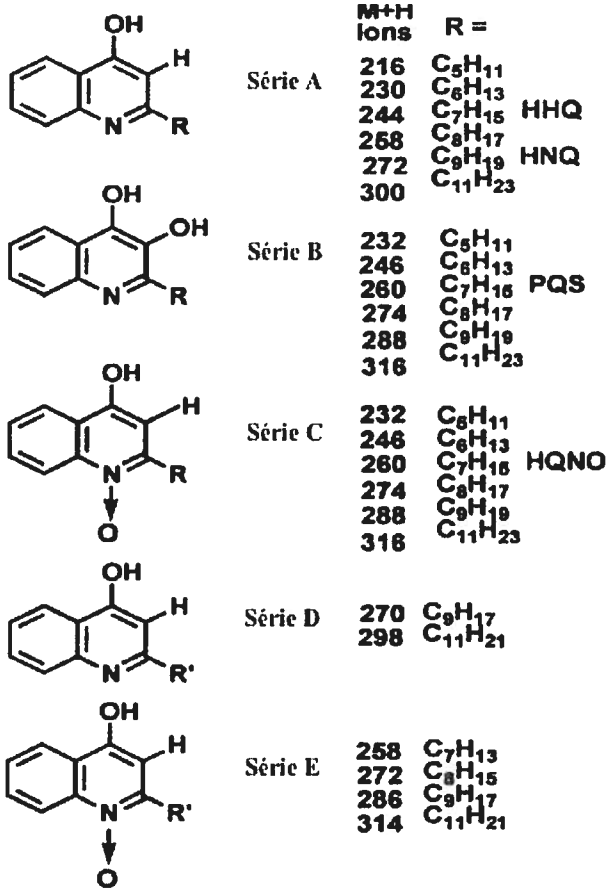


Figure 1.4 Structures des cinq familles de HAQ. R = saturé, R' = insaturé. D'après Déziel *et al.* (2004).

La similarité de la structure des HAQ en plus du marquage à l'AA-d4 suggèrent une voie commune de biosynthèse. L'ajout d'intermédiaires marqués au deutérium a démontré que le HHQ est le précurseur direct du PQS mais pas celui des N-oxides (fig. 1.5) (Déziel *et al.*, 2004). La série A est le précurseur de la série des composés B (fig. 1.4). Le PQS semble être un produit final de la biosynthèse des HAQ ou n'est tout simplement pas converti en un composé extracellulaire. L'origine des N-oxides n'est pas déterminée (séries C et E) (fig. 1.4), mais appartiennent tout de même aux HAQ vu le résultat du marquage au AA-d4. Les N-oxides ne semblent pas synthétisés en aval du HHQ ou du PQS, ces produits deutérés ne donnant pas de N-oxides marqués. De plus, un ajout de

HQNO-d4 à une culture de PA14 ne donne aucun congénère marqué. Considérant son activité antibactérienne et inhibiteur de cytochrome, le HQNO pourrait bien être un produit final de la biosynthèse des HAQ (Déziel *et al.*, 2004). Enfin, la concentration des séries A, B et D diminuent après l'atteinte d'un niveau maximal alors que la concentration des N-oxides (séries C et E) demeure stable (Lépine *et al.*, 2003).

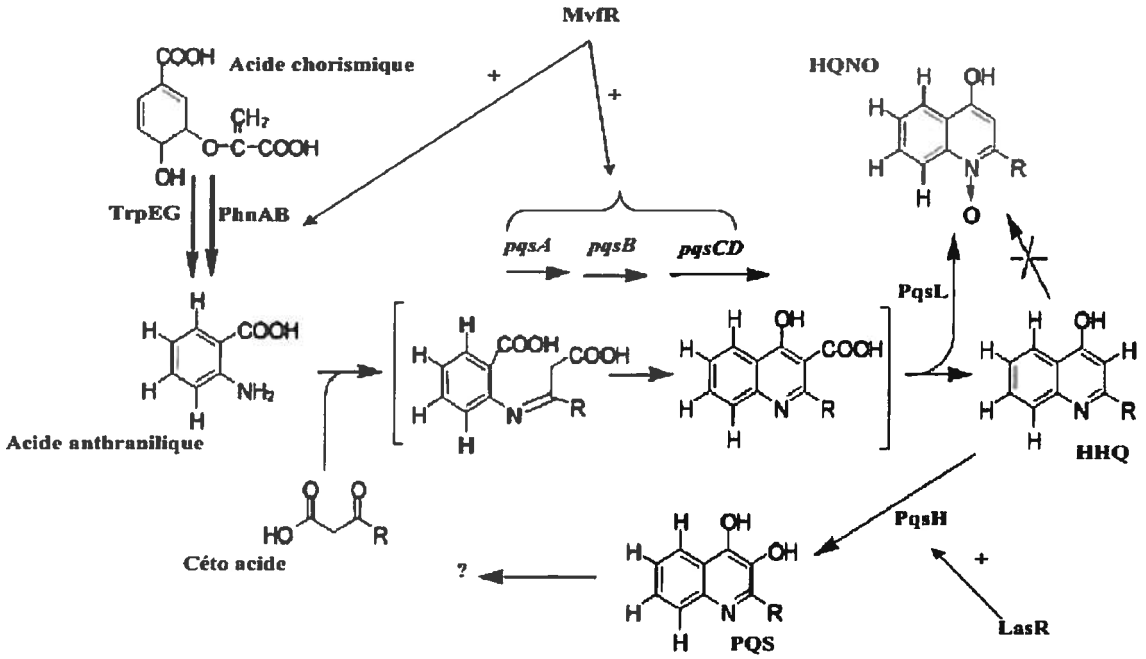


Figure 1.5 La biosynthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. Les structures entre parenthèses sont hypothétiques. Adaptée d'après Déziel *et al.* (2004).

Lépine et al. ont analysé en LC/MS un mutant *pqsL*. Il avait été proposé que ce gène contribue à la dégradation du PQS (D'Argenio *et al.*, 2002). Il a été découvert que le mutant *pqsL* ne produit pas de N-oxides saturés ou insaturés (séries C et E). Tous les autres HAQ sont produits en concentrations normales. *pqsL* est donc relié à la biosynthèse des N-oxides (fig. 1.5) (Lépine *et al.*, 2004). Il est prédit que le gène *pqsL* code pour une enzyme reliée aux monoxygénases (D'Argenio *et al.*, 2002), ce qui pourrait être à l'origine de l'oxydation de l'azote du HHQ en N-oxide mais il n'a pas été possible d'observer cette réaction avec du HHQ-d4 fourni à une culture de *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2004)

PqsH, une enzyme codant pour une monoxygénase est requise pour la synthèse du PQS

(Gallagher *et al.*, 2002). Le gène *pqsH* est contrôlé par le système de QS, sous la régulation de LasR (fig. 1.5) (Whiteley, Lee et Greenberg, 1999). L'étape finale de la synthèse du PQS dépend donc du quorum sensing et ce dernier régule positivement l'expression de *rhlI* et *rhlR* en plus d'induire la transcription de l'élastase *lasB* (fig. 1.7, tableau 1.1) (Calfee, Coleman et Pesci, 2001; Gallagher *et al.*, 2002; McKnight, Iglewski et Pesci, 2000; Pesci *et al.*, 1997). Il a été découvert que le PQS est capable de contrôler des gènes dépendants du régulateur transcriptionnel RhlR et ce sans agir sur le système *rhl* (Diggle *et al.*, 2003; Déziel *et al.*, 2003).

1.8.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR

En exploitant la capacité de *P. aeruginosa* d'infecter une variété de vertébrés et de non vertébrés, l'équipe du Dr. Rhame a développé des systèmes modèles qui emploient des nématodes en complément aux modèles mammifères pour aider à élucider les facteurs de virulence responsables de la pathogénie de *P. aeruginosa*. Les études indiquent un degré remarquable de conservation dans les mécanismes de virulence employés par *P. aeruginosa pour* infecter des hôtes d'origines évolutionnaires divergentes (Rahme *et al.*, 2000). L'un de ces facteurs identifiés fut MvfR, un régulateur transcriptionnel associé au quorum sensing. Le gène correspondant, *mvfR*, est nécessaire à la pleine virulence chez plusieurs hôtes. Son inactivation affecte la production de facteurs régulés par le QS dont la pyocyanine, les protéases élastolytiques ainsi que différentes molécules sécrétées (Cao *et al.*, 2001; Rahme *et al.*, 1997).

MvfR régule l'expression de *phnAB*. La traduction de cet opéron produit l'anthranilate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide anthranilique (Cao *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* possède deux anthranilate synthases, l'une encodée par *trpE* et *trpG*, qui catalyse la première étape de la biosynthèse du tryptophane (Essar *et al.*, 1990). L'autre anthranilate synthase encodée par *phnA* et *phnB*, est nécessaire à la production des phénanzines (fig. 1.5) (Essar *et al.*, 1990a). L'analyse comparative du transcriptôme de PA14 et du mutant *mvfR* a permis d'observer cinq gènes, *pqsABCDE* (fig. 1.6), tout juste en amont de l'opéron *phnAB* sur le chromosome de PA14. Le profil d'expression est semblable dans le mutant *mvfR*, la transcription des 7 gènes est abolie (Déziel *et al.*,

2004). L'inactivation des gènes *pqsA* et *pqsB* empêche la production des HAQ et il y a accumulation du précurseur, l'acide anthranilique. Une inactivation de *pqsE* n'affecte pas la production de PQS ni des autres HAQ ni de l'AA (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002). La complémentation génétique suggère que les gènes *pqsABCDE* forment un seul opéron (Gallagher *et al.*, 2002). MvfR contrôle donc l'expression des opérons *phnAB* et *pqsABCDE*, lesquels sont requis pour la synthèse des HAQ mis à part le gène *pqsE* (fig. 1.5) (Cao *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; McGrath, Wade et Pesci, 2004). La conversion du HHQ en PQS ne se fait pas sous la régulation de *mvfR*. La série A dont fait partie le HHQ est le produit final de la biosynthèse des HAQ sous le contrôle de *mvfR*. La série A est ensuite convertie en série B (PQS) via *lasR* par l'enzyme PqsH (Déziel *et al.*, 2004).

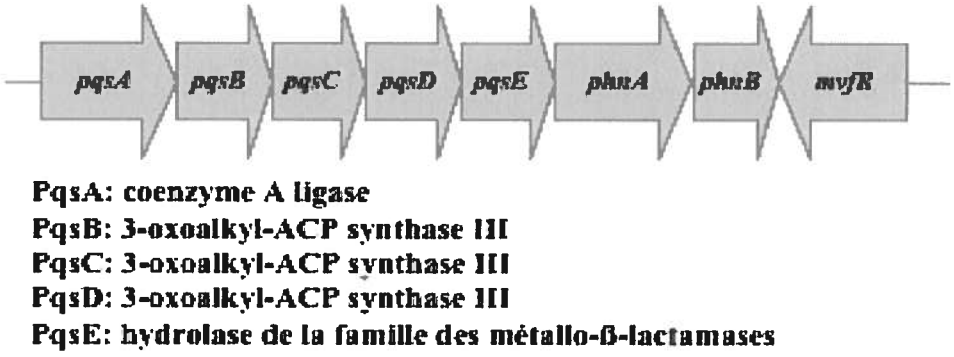


Figure 1.6 Fonction problable des enzymes de l'opéron *pqs*. PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont nécessaires à la biosynthèse des HAQ et PqsE est nécessaire à la pleine virulence de *P. aeruginosa.* [www.pseudomonas.com]

L'article de Déziel *et al.* paru en 2005 montre que *mvfR* joue un rôle dans la régulation de multiples gènes contrôlés par le quorum sensing sans affecter l'expression de *lasRI/rhlRI.* De plus, la production d'acylhomosérines lactones n'est pas affectée dans un mutant *mvfR.* Le système MvfR, avec la contribution essentielle de PqsE, régule positivement un sous-groupe de gènes dépendants de LasR et RhlR. MvfR contribue à la virulence de *P. aeruginosa* en contrôlant la transcription de gènes qui ne sont pas sous le contrôle de RhlR. La virulence réduite d'un mutant *mvfR* n'est pas seulement causée par la perte de la production des HAQ mais aussi par l'inhibition de l'expression de *pqsE* (Déziel *et al.*, 2005).

1.8.4 La régulation du quorum sensing

Un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation de la cascade d'activation du quorum sensing ont été rapportés dans la littérature (fig. 1.7) (Chugani *et al.*, 2001; Pessi *et al.*, 2001). Il a été démontré que GacA, un régulateur transcriptionnel global contrôle positivement le système *lasRI* (Reimmann *et al.*, 1997), ainsi que Vfr, lequel est requis pour la transcription de *lasR* (Albus *et al.*, 1997). Un autre régulateur, RsaL, pourrait agir en tant qu'inhibiteur, vu la répression qu'il exerce sur la transcription de *lasI* (de Kievit *et al.*, 1999). Dernièrement, QscR a été identifié comme inhibiteur de l'activation prématurée de *lasI* lorsque la densité cellulaire est peu élevée (Chugani *et al.*, 2001). RsmA, un autre régulateur, semble moduler le QS en inhibant à la fois l'expression de *lasI* et *rhlI* et en affectant la production de facteurs de virulence (Pessi *et al.*, 2001). Plusieurs autres gènes sont inclus dans la régulation du QS, voir la figure 1.7.

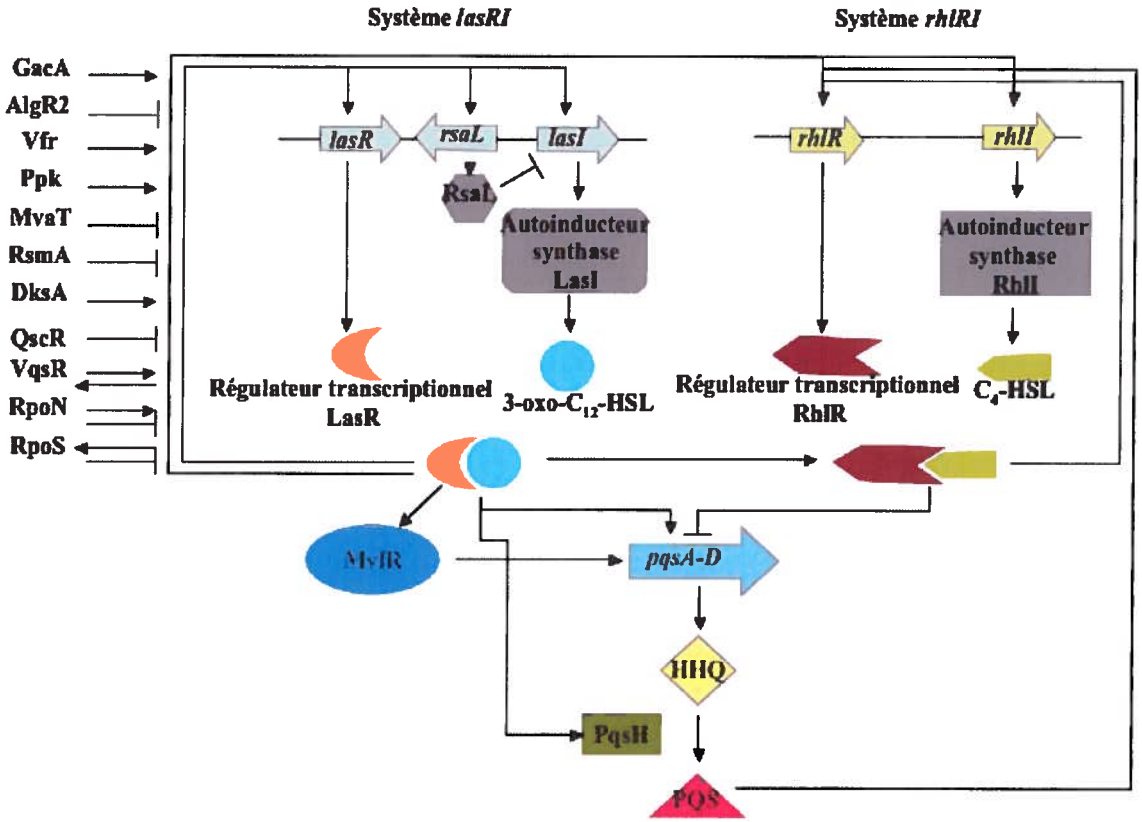


Figure 1.7 Contrôle du quorum sensing chez *P. aeruginosa*. Les deux systèmes *las* et *rhl* sont sujets à la modulation par de nombreux régulateurs additionnels apportant un réglage précis du QS. Adaptation

d'après Juhas *et al.* (2005). Flèche = activation, T = inhibition.

La réponse stringente, un important phénomène physiologique répondant à un stress nutritionnel, semble pourvoir activer le circuit du quorum sensing chez *P. aeruginosa*. Indépendamment de la densité cellulaire, un changement survient dans la transcription des gènes régulateurs ainsi que dans la cinétique de production des autoinducteurs (van Delden, Comte et Bally, 2001). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans l'environnement, les bactéries doivent vivre des périodes de jeûne par manque d'une source de carbone ou d'acides aminés, indépendamment de leur densité cellulaire. *P. aeruginosa* peut, à l'intérieur d'un hôte, vivre un stress nutritionnel avant d'atteindre le seuil critique de la production des autoinducteurs permettant l'activation du QS. Dans ce genre de situation, la réponse stringente peut activer prématurément la production de facteurs de virulence régulés par le QS. Ces facteurs pourront donc permettre aux bactéries présentes l'accès à de nouveaux nutriments grâce à leur activité enzymatique. Ils pourront aussi permettre la dissémination de la population dans d'autres niches plus favorables (van Delden, Comte et Bally, 2001).

1.8.5 La communication cellulaire

Plusieurs faits suggèrent que le HHQ fonctionne à la manière d'un messager intercellulaire. Il est retrouvé dans le milieu, sa concentration augmente lors de la phase exponentielle de croissance et diminue lors de la production du PQS. À l'aide du marquage au deutérium, Déziel *et al.* ont observé que le HHQ-d4 exogène est repris par les cellules bactériennes, converti en PQS-d4 et relargué dans le milieu (fig. 1.8) (Déziel *et al.*, 2004). La production du HHQ et du PQS se fait sous le contrôle de différents régulateurs, MvfR pour le HHQ et LasR pour le PQS. De plus, on soupçonne ces deux molécules d'être produites dans différents compartiments cellulaires. Selon le programme PSORT, la localisation de l'enzyme PqsH monoxygénase, qui permet l'hydroxylation du HHQ en PQS, est prédite dans l'espace périplasmique. Ceci permet donc de croire que le HHQ fait partie d'une conversation cellulaire. Le HHQ est produit et rejeté par une cellule bactérienne. Une autre cellule récupère le HHQ, le transforme en PQS et le rejette à son tour (fig. 1.8) (Déziel *et al.*, 2004).

Le HHQ et le PQS peuvent transmettre des informations différentes. Le HHQ reflète le niveau de HAQ extracellulaires, incluant les fonctions antimicrobiennes et inhibitrices de cytochrome et indique le niveau d'activité de MvfR. Le PQS peut révéler l'activité de LasR et le niveau des AHL du quorum sensing dans la régulation de la croissance de la population. Il est à noter que le HHQ et le PQS sont des molécules retrouvées associées en grande quantité aux cellules bactériennes (Lépine *et al.*, 2003). Le PQS présente une solubilité limitée dans des solutions aqueuses de par sa nature très hydrophobe alors que le HQNO est principalement retrouvé dans le milieu de culture. Le PQS possède donc une grande affinité pour les membranes riches en lipides des cellules bactériennes (Lépine *et al.*, 2003). D'ailleurs, l'attachement des 2-alkyl-4-hydroxyquinolines aux membranes cellulaires a déjà été observé (Royt *et al.*, 2001). La possibilité d'une communication intercellulaire par des HAQ serait également possible par un contact cellule-cellule.

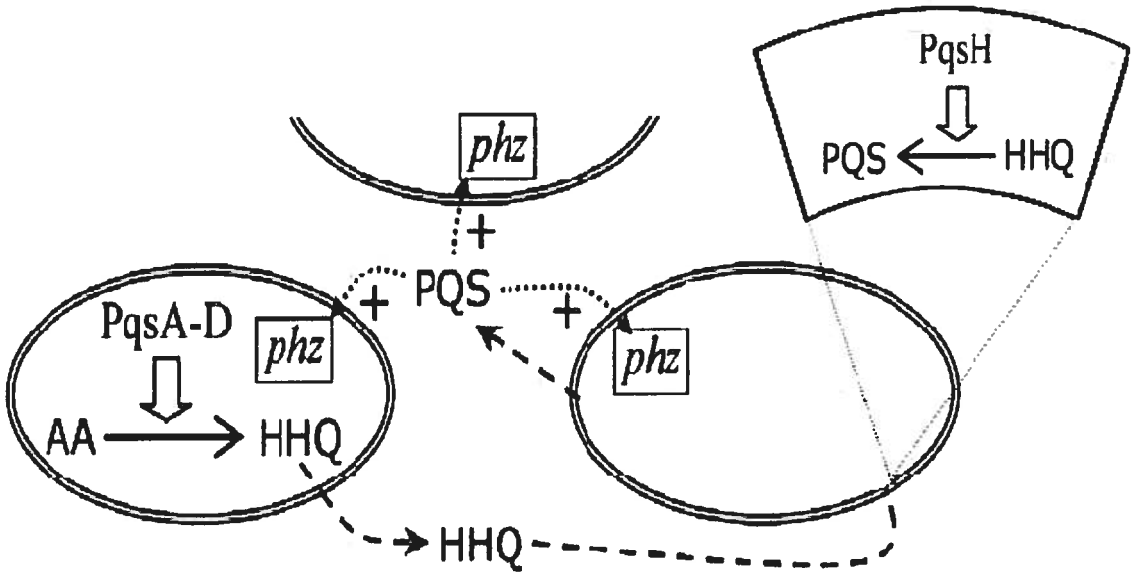


Figure 1.8 Modèle de communication cellulaire HHQ/PQS. Le HHQ est produit par une cellule, rejeté dans le milieu et repris par une autre cellule. Le HHQ est transformé en PQS dans le périplasme et rejeté dans le milieu. Le PQS peut activer l'expression de gènes dont l'opéron *phz*. Adaptation d'après Déziel *et al.* (2004).

1.8.6 Le quorum sensing et la formation de biofilms

L'évolution de la microcolonie à un biofilm mature enveloppé dans une matrice de polysaccharides extracellulaires semble être provoquée à la fois par des facteurs extracellulaires et des signaux du quorum sensing (Fuqua, Winans et Greenberg, 1994). Des mutants dépourvus d'autoinducteurs forment des biofilms plus minces et moins structurés que la souche sauvage. Ces mutants sont pourtant moins sensibles aux biocides et leur aptitude à former des biofilms n'est pas complètement bloquée (Davies *et al.*, 1998). Les gènes dépendants du QS sont fortement exprimés chez les cellules se retrouvant à la surface d'un biofilm. L'expression de ces même gènes diminue chez les cellules qui se situent au centre du biofilm (De Kievit *et al.*, 2001). Le rôle du QS semble négligeable lors des premières étapes de la formation d'un biofilm. Cependant, le QS semble requis pour l'adaptation des cellules individuelles en une structure multicellulaire complexe ainsi que pour la différentiation d'un biofilm mature en une structure typique ayant la forme d'un champignon. Il a d'ailleurs été démontré chez *P. aeruginosa* que des molécules du quorum sensing étaient présentes dans les poumons de patients souffrants de fibrose kystique (Singh *et al.*, 2000). Ceci suggère qu'il serait possible de faire du QS une cible dans la prévention de la formation de biofilms. Il a été démontré que le 3-oxo-C_{12}-HSL est requis pour l'établissement d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1998). Le gène de l'autoinducteur synthase *lasI* est exprimé dans un grand nombre de cellules lors de la phase initiale du développement du biofilm (De Kievit *et al.*, 2001). Au contraire, *rhlI* est peu exprimé dans la phase initiale mais le système est activé plus tard lors de la maturation du biofilm (Sauer *et al.*, 2002). Des taux élevés du quotient C4-HSL/3-oxo-C12-HSL ont été observés dans le tissus pulmonaire de patients ayant la fibrose kystique et infectés par *P. aeruginosa* (Favre-Bonte *et al.*, 2002). Le système *rhlRI* semble important pour la survie de la bactérie dans un biofilm en conditions anaérobiques (Yoon *et al.*, 2002). Enfin, la production des rhamnolipides dépend du système *rhlRI* et le maintien de l'architecture du biofilm repose sur les rhamnolipides (Davey, Caiazza et O'Toole, 2003).

1.8.7 Le quorum sensing et les facteurs de virulence

Plusieurs observations indiquent que le quorum sensing joue un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa* en dirigeant l'expression de divers facteurs de virulence (de Kievit *et al.*, 1999). Des mutants *las* et *rhl* sont atténués de manière significative dans leur capacité à provoquer l'inflammation et causer la mort chez des rats adultes (Lesprit *et al.*, 2003).

Le système *lasRI* régule l'expression de *lasB*. Ce même système est requis pour une production optimale d'autres facteurs de virulence extracellulaires dont la protéase LasA et l'exotoxine A (tableau 1.1) (Gambello, Kaye et Iglewski, 1993). Le système *lasRI* induit la transcription de gènes codant des protéines nécessaires au système sécrétoire de *P. aeruginosa* (Chapon-Herve *et al.*, 1997). Le quorum sensing contrôle la production de facteurs de virulence directement au niveau de l'expression et indirectement au niveau de l'export transmembranaire (Van Delden, 2004).

Le système *rhlRI* régule l'expression de l'opéron *rhlAB* codant pour la rhamnosyltransférase. Cette enzyme est nécessaire à la production de rhamnolipides (Ochsner, Fiechter et Reiser, 1994). Le système *rhlRI* est aussi important pour la production optimale de l'élastase LasB, la protéase LasA, la pyocyanine et la protéase alcaline (tableau 1.1) (Brint et Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1995; Pearson, Pesci et Iglewski, 1997; Reimmann *et al.*, 1997).

Tableau 1.1 Facteurs de virulences contrôlés par le système de quorum sensing chez *P. aeruginosa*. (Van Delden, 2004)

Sous le contrôle de las	Sous le contrôle de rhl	Sous le contrôle du PQS
Synthèse du PQS	Synthèse du PQS	Système rhl
Système rhl	Rhamnolipides	Rhamnolipides
Formation de biofilm		Formation de biofilm
Protéase alkaline	Protéase alkaline	
Élastase	Élastase	Élastase
	Pyocyanine	Pyocyanine
Lipase	Lipase	
	Lectines A et B	Lectines A et B
Cyanide d'hydrogène	Cyanide d'hydrogène	
Sécrétion Xcp	Sécrétion Xcp	
	Chitinase	
	RpoS	
Exotoxine A		
Neuraminidase		
Endoprotéase		
Catalase		
Superoxide dismutase		
Aminopeptidase		
Swimming		
	Exoenzyme S	
Swarming	Swarming	
Twitching	Twitching	

Des tests *in vitro* ont montré que les AHL sont produits dans des isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients ayant la fibrose kystique (Geisenberger *et al.*, 2000) ainsi que dans le sputum (Middleton *et al.*, 2002) et le tissus pulmonaire (Favre-Bonte *et al.*, 2002). Le HHQ et le PQS sont présents dans les poumons de ces patients (Collier *et al.*, 2002).

Il est maintenant connu que le quorum sensing est requis pour la virulence de *P. aeruginosa* dans divers modèles animaux d'infection (Rumbaugh, Griswold et Hamood, 2000). La production *in vivo* des deux autoinducteurs a été démontrée dans un modèle de souris à pneumonie chronique (Wu *et al.*, 2000). Les modèles animaux utilisés incluent un modèle de pneumonie aigue néonatal et adulte chez la souris (Pearson *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1996). Il y a aussi un modèle d'infections pulmonaire aigue et chronique chez le rat (Lesprit *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001) et enfin un modèle de souris à blessures thermiques (Rumbaugh, Griswold et Hamood, 1999; Rumbaugh *et al.*,

1999). Ces modèles ont permis de faire des études sur des souches de *P. aeruginosa* mutées dans *lasR*, *lasI* et *rhlI*. Le blocage de l'expression des gènes de virulence régulés par le QS diminue la destruction des tissus. Une diminution des cas de pneumonies, de dissémination et une baisse de mortalité à été observée comparativement aux souches sauvages. Ceci démontre bien l'importance d'un système de QS fonctionnel pour la virulence de *P. aeruginosa*. Il est à noter que ces mutants n'étaient jamais complètement avirulents. Il est permis de supposer que la pathogénicité de *P. aeruginosa* lors d'infections est multifactorielle. D'autres facteurs indépendants du QS semblent contribuer à sa virulence (Van Delden, 2004). La production d'autoinducteurs par *P. aeruginosa* isolé de patients colonisés ayant la fibrose kystique a été démontrée *in vitro* (Geisenberger *et al.*, 2000), *ex vivo* dans le sputum (Singh *et al.*, 2000) et *in situ* dans les tissus pulmonaires (Favre-Bonte *et al.*, 2002). Le PQS a aussi été détecté dans des échantillons respiratoires provenant de patients ayant la fibrose kystique. Il s'agit d'un autre indicateur de la production *in vivo* d'un signal intercellulaire produit par *P. aeruginosa* lors d'infections pulmonaires dans le cas de la fibrose kystique (Collier *et al.*, 2002).

Des analyses transcriptomiques ont permis de vérifier le contrôle général du quorum sensing sur la régulation de l'expression des gènes. Ces études (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley, Lee et Greenberg, 1999) montrent que le QS ne contrôle pas seulement la virulence de *P. aeruginosa* mais aussi des gènes impliqués dans des fonctions élémentaires. Le QS contrôle des groupes de gènes impliqués dans le chemotactisme et la formation de biofilms. L'activation du QS semble s'effectuer sur une base continue. Certains gènes sont activés très tôt dans la courbe de croissance alors que d'autres sont activés lors de la phase exponentielle et plus tardivement durant la phase stationnaire (Schuster *et al.*, 2003).

Faits intéressants, des isolats cliniques déficients dans la production de facteurs de virulence extracellulaires et régulés par le quorum sensing ont été découverts. La majorité des isolats étaient affectés au niveau de l'expression des gènes *lasB* et *toxA*, importants pour la production de l'élastase et de l'exotoxine A (Hamood, Griswold et Colmer, 1996;

Pritchard et Vasil, 1990; Rumbaugh, Griswold et Hamood, 1999). Un mutant *lasR* isolé d'une plaie était capable de produire des signaux du quorum sensing (Hamood, Griswold et Colmer, 1996) ainsi qu'un mutant *rhlR* isolé d'une infection urinaire (Schuster *et al.*, 2003).

1.8.8 Le quorum sensing et la réponse immunitaire

Le 3-oxo-C_{12}-HSL semble être un important modulateur de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection (Smith et Iglewski, 2003). La molécule semble impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa* en altérant la réponse immunitaire (Rumbaugh, Griswold et Hamood, 2000). Cette molécule inhibe la prolifération des lymphocytes, stimule la production d'interleukine IL-8 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales des bronches et stimule les cellules T à produire des interférons INF-γ. Le 3-oxo-C_{12}-HSL est aussi un chémoattracteur et un activateur des leucocytes dans les fibroblastes humains (DiMango *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002; Telford *et al.*, 1998). Ultimement, une telle action provoquera la libération de protéinases et de molécules pro inflammatoires dans la région affectée (Rainger *et al.*, 1995).

1.8.9 Les inhibiteurs du quorum sensing

La communauté scientifique recherche des alternatives pour contrôler les infections à *P. aeruginosa* à cause de sa résistance à de multiples drogues et de la fréquence des infections qu'il cause en milieu hospitalier. Des inhibiteurs du quorum sensing sont activement recherchés en tant que nouveaux traitements contre *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2003). Le QS régule un ensemble de facteurs chez *P. aeruginosa.* Une mutation du système de quorum sensing atténue la virulence du microorganisme. Il est donc concevable d'envisager le QS comme une cible dans la lutte contre les infections par cet organisme. Plus particulièrement, le contrôle des facteurs de virulence a été proposé afin d'empêcher *P. aeruginosa* de déjouer les mécanismes de défense de l'hôte (Van Delden et Iglewski, 1998). Une atténuation de la virulence de la bactérie pourrait contribuer à l'élimination de l'infection à l'aide de la réponse immunitaire de l'hôte.

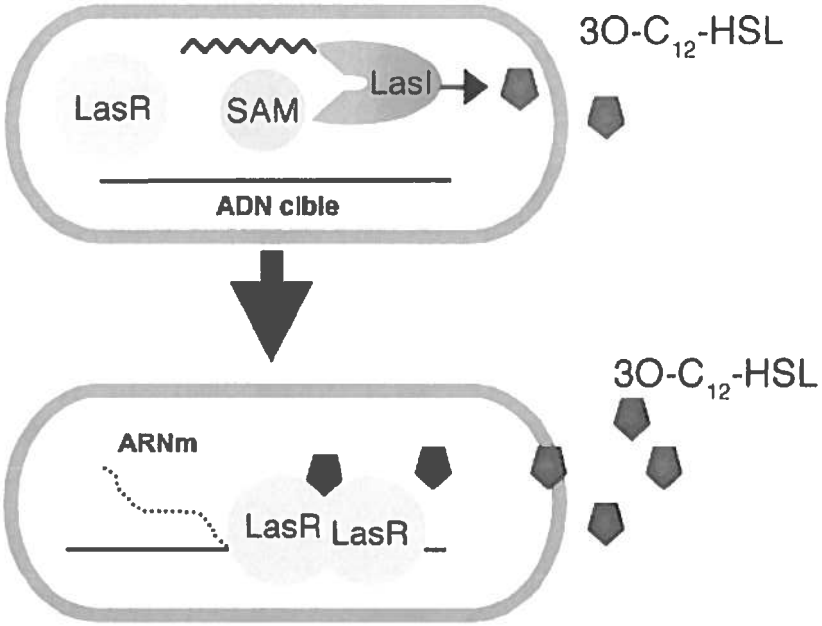


Figure 1.9 Transcription des gènes par le système *las*. L'AHL synthase LasI utilise la méthionine S-adénosyl (SAM) et une « acyl carrier protein » (ACP) pour former le 3-oxo-C_{12}-HSL. Lorsque la concentration d'autoinducteur augmente, le 3-oxo-C_{12}-HSL se lie au régulateur LasR, provoquant la dimérisation, l'attachement à l'ADN et la transcription des gènes sous le contrôle de LasR. Un mécanisme similaire se produit dans le système *rhl*. D'après Smith et Iglewski (2003).

Différentes stratégies « anti-virulence » ont été développées dont l'utilisation d'antagonistes des autoinducteurs (Fast, 2003; Hentzer *et al.*, 2002; Smith, Bu et Suga, 2003), d'enzymes dégradant les autoinducteurs (Dong *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Reimmann *et al.*, 2002) et d'inhibiteurs des synthases d'autoinducteurs dont le macrolide azithromycin (Favre-Bonte, Kohler et Van Delden, 2003; Tateda *et al.*, 2001).

1.8.9.1 Les antagonistes des acylhomosérines lactones

Un des mécanismes pouvant inhiber l'activation de LasR ou RhlR est l'utilisation d'analogues d'acylhomosérines lactones. Ils agiraient en tant qu'antagonistes du 3-oxo-C_{12}-HSL et du C_4-HSL. Ces analogues auraient une structure similaire aux AHL naturelles produites par *P. aeruginosa*. Il pourrait alors y avoir compétition pour l'attachement à LasR ou RhlR. Les variations de structure des molécules 3-oxo-C_{12}-HSL et C_4-HSL ont révélés d'importants épitopes pour l'activation et l'inhibition de l'activité

de LasR (Passador *et al.*, 1996; Smith, Bu et Suga, 2003). Smith et al. ont d'ailleurs développé une méthode de criblage permettant d'identifier un groupe de composés capables de compétitionner avec le 3-oxo-C_{12}-HSL et d'inhiber l'activation de LasR ainsi que la production d'élastase (Smith, Bu et Suga, 2003). D'autres études ont permis d'identifier un composé furanone halogéné synthétique, capable d'inhiber la production de plusieurs facteurs induits par le QS (Hentzer *et al.*, 2003). Une analyse par micropuce à ADN de *P. aeruginosa* exposée à l'inhibiteur a révélé que 80% des gènes réprimés étaient régulés par le QS. Ce résultat montre bien la spécificité du furanone pour le système de QS. Un test sur un modèle d'infection pulmonaire chronique de *P. aeruginosa* chez la souris traitée au furanone a montré une diminution du nombre de bactéries isolées des poumons. Le grand avantage de l'utilisation de tels inhibiteurs est leur petite structure ainsi que leur facilité de diffusion (Smith et Iglewski, 2003).

Chez *Escherichia coli*, des analogues spécifiques du N-3-oxohexanoyl homosérine lactone chez *Vibrio fischeri* ainsi que le 3-oxo-C_{12}-HSL chez *P. aeruginosa* ont compétitionné pour l'attachement à LuxR et LasR. Ils agissent comme antagonistes de l'activité de LuxR et LasR (Kline *et al.*, 1999; Schaefer *et al.*, 1996). Une algue marine produit des furanones présentant des similarités structurelles avec les acylhomosérines lactones. Elles peuvent inhiber les AHL chez *Vibrio fischeri* et *Serratia liquefaciens* (Givskov *et al.*, 1996). Il a été démontré qu'un agent antimicrobien, le Triclosan, produit un effet sur la production de signaux intercellulaires. Il inhibe FabI, une réductase transporteur de la fonction acyle qui est importante dans la synthèse du C_4-HSL et du 3-oxo-C_{12}-HSL par *P. aeruginosa* (Hoang et Schweizer, 1999).

1.8.9.2 Les anticorps

Les acylhomosérines lactones diffusent et sont activement rejetées à l'extérieur de la cellule bactérienne. Une fois dans l'environnement externe, les AHL représentent des cibles potentielles pour leur inactivation. Le potentiel des anticorps spécifiques aux AHL a été évalué pour inhiber l'activité de ces molécules. Une fois diffusées dans l'environnement extracellulaire, les AHL peuvent être liées à ces anticorps. Ceci les

empêche d'interagir avec les cellules eucaryotes, de retourner dans les cellules bactériennes et d'activer leur régulateur transcriptionnel respectif (Smith et Iglewski, 2003).

1.8.9.3 La lactonase

Plusieurs études ont identifié une enzyme, la lactonase, produite par plusieurs genres bactériens incluant *Bacillus sp.*, *Variovorax paradoxus*, *Arthrobacter sp.* et *Arthrobacter tumefaciens* (Carlier *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2002; Leadbetter et Greenberg, 2000; Park *et al.*, 2003). Ces enzymes sont capables de cliver l'anneau lactone et ainsi de rendre non fonctionnelles les molécules d'AHL qui sont incapables d'activer leur régulateur transcriptionnel. Une de ces enzymes a été exprimée chez *P. aeruginosa*. Une diminution significative de la production des AHL et de l'expression des facteurs de virulences s'est produite (Reimmann *et al.*, 2002). Malheureusement ces enzymes ne représentent pas la solution idéale vu la difficulté d'acheminer une enzyme active au site d'infection (Smith et Iglewski, 2003).

1.8.9.4 La biosynthèse des acides gras

Les AHL synthases LasI et RhlI utilisent des intermédiaires de biosynthèse des acides aminés et des acides gras pour produire les acylhomosérines lactones. L'anneau des AHL provient d'une méthionine S-adénosyle (SAM) et la chaîne acyle provient de la protéine transporteuse de la fonction acyle (ACP) (Hoang et Schweizer, 1999; Parsek *et al.*, 1999). La protéine LasI est capable d'utiliser des chaînes de longueur variables mais a une préférence pour les chaînes acyles à 12 carbones. En conditions limitantes, la biosynthèse des acides gras a provoqué une augmentation des acyl-ACP à chaînes courtes, résultant en la saturation de LasI. Une diminution de la production des 3-oxo-C12-HSL actives a été enregistrée (Hoang *et al.*, 2002). Le contrôle des substrats de LasI peut donc avoir un effet sur la production d'AHL (Smith et Iglewski, 2003).

1.8.9.5 Les facteurs de régulation

Plusieurs facteurs incluant GacA, Vfr et RelA régulent positivement l'expression de LasR (de Kievit et Iglewski, 2000; Van Delden et Iglewski, 1998). La suppression de *vfr* élimine toute expression de *lasR* et réduit la production des facteurs de virulence. La suppression de GacA réduit aussi la production des facteurs de virulence et diminue la pathogénicité chez un modèle de souris à brûlure thermique infectée par *P. aeruginosa* de souris. Ces résultats démontrent l'importance de ces facteurs régulateurs dans le contrôle du quorum sensing chez *P. aeruginosa* ainsi que dans la production de facteurs de virulence. L'importance de ces facteurs de régulation dans l'activation du QS a été démontrée dans des études transcriptionnelles. L'addition d'AHL exogène à une culture de faible densité cellulaire n'a pas permis l'induction prématurée de l'expression des gènes de virulence. La production d'autres facteurs semble nécessaire avant l'induction du QS (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003). Il semblerait que les divers facteurs impliqués dans la régulation du QS pourraient devenir des cibles idéales pour bloquer l'induction de la virulence chez *P. aeruginosa* (Smith et Iglewski, 2003).

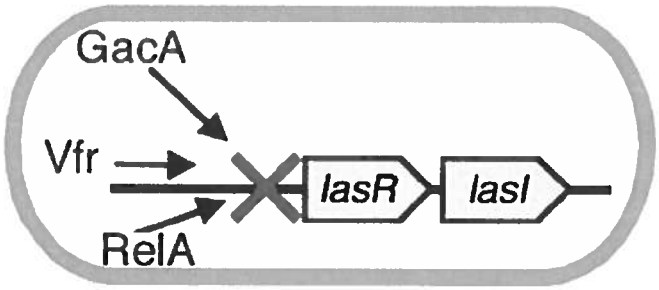


Figure 1.10 Empêcher l'induction du QS en inhibant les facteurs régulant *lasR* et *lasI* (*rhlR* et *rhlI*). D'après Smith et Iglewski (2003).

1.8.9.6 Les oligonucléotides antisens

L'utilisation d'oligonucléotides antisens se liant spécifiquement aux transcrits *lasR/lasI* et *rhlR/rhlI* pourrait inhiber l'expression des gènes. L'utilisation de cette technologie afin d'inhiber spécifiquement la traduction de gènes particuliers a été étudiée dans des

systèmes eucaryotes et en sont maintenant à des essais cliniques (Kurreck, 2003). Des études chez *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* et *E. coli* ont montré que des oligonucléotides antisens peuvent se lier spécifiquement au transcrit et inhiber l'expression du gène (Good *et al.*, 2001; Harth *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2001). Une telle méthode présente plusieurs obstacles dont la perméabilité de la cellule et l'efficacité du mode de transport au site requis. L'avantage de cette technologie est que la régulation antisens est un phénomène commun chez les bactéries et que ce mécanisme de régulation est relativement différent de la plupart des antibiotiques (Ji *et al.*, 2001).

1.8.9.7 Des inhibiteurs prometteurs

L'algue rouge *Delisea pulchra* produit des furanones halogénés (fig. 1.11) biologiquement actifs dans la nature (de Nys et al., 1993). Ces métabolites sont retrouvés à la surface des algues à des concentrations pouvant inhiber la colonisation par des procaryotes ainsi que des eucaryotes (de Nys et al., 1995, 2002; Maximilien et al., 1998; Dworjanyn et al., 1999). Il a été découvert que ces composés sont des inhibiteurs du QS (Givskov *et al.*, 1996; Hentzer *et al.*, 2002). Le furanone C-30 (fig. 1.11) et le C-56, des dérivés synthétiques d'un furanone naturel, peuvent agir en tant qu'antagonistes du quorum sensing chez les mammifères (Hentzer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Le furanone C-30 cible spécifiquement le système du quorum sensing et inhibe l'expression des facteurs de virulence. L'effet de la molécule sur un biofilm de *P. aeruginosa* a augmenté la sensibilité à la tobramycine ainsi qu'au SDS. Dans un modèle de souris à infection pulmonaire, la molécule a inhibé le QS du microorganisme et a permis l'élimination naturelle du pathogène par le système immunitaire de la souris (Hentzer et Givskov, 2003).

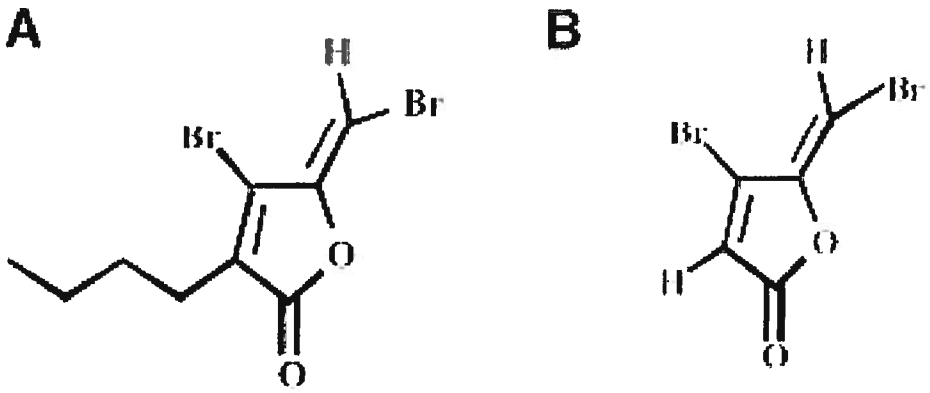


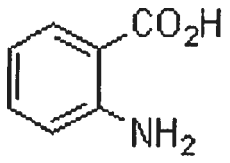
Figure 1.11 Du métabolite à la drogue. (A) Furanone naturel de l'algue rouge *D. pulchra*. (B) Composé C-30, un furanone synthétique ayant une activité d'inhibition du QS. D'après Hentzer *et al.* (2003).

Des molécules produites par des espèces de *Penicillium,* la patuline et l'acide pénicillique, ont été identifiées comme étant biologiquement actives en tant qu'inhibiteurs du quorum sensing. De plus, il a été trouvé que la patuline augmente la sensibilité d'un biofilm de *P. aeruginosa* aux traitements à la tobramycine (Rasmussen, *et al.*, 2005b). Des extraits d'ail ont aussi montré une spécificité dans l'inhibition de gènes de virulence contrôlés par le quorum sensing chez *P. aeruginosa.* Il s'est révélé que l'inhibition du QS est dépendante de la concentration de l'extrait d'ail. De plus, la diminution de la résistance d'un biofilm à la tobramycine ainsi que l'atténuation de la virulence de *P. aeruginosa* PAO1 chez *C. elegans*, un modèle de nématode, ont été remarquées. Par ailleurs, l'extrait d'ail rend *P. aeruginosa* sensible à la phagocytose des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et améliore la résistance aux infections pulmonaires ultérieures. Un traitement serait donc une approche possible dans l'atténuation de la virulence et du contrôle des infections à *P. aeruginosa.* Des travaux sont en cours pour ce qui est de l'isolement et de la caractérisation du composé responsable de l'inhibition du QS dans l'extrait d'ail (Bjarnsholt *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2005a).

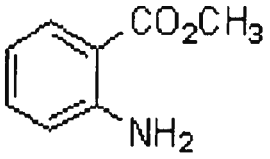
1.8.9.8 Le précurseur des HAQ

Les précurseurs des signaux intercellulaires peuvent à leur tour servir de cible dans la création de nouvelles thérapies contre *P. aeruginosa.* Calfee *et al.* (2001) ont démontré que l'acide anthranilique était le précurseur du PQS. Des études avaient déjà montré que

des analogues de l'AA pouvaient inhiber l'activité de l'anthranilate synthase (Held et Smith, 1970; Moyed, 1960). Calfee *et al.* (2001) ont également trouvé que la quantité de PQS présente dans le surnageant de la culture diminuait avec une augmentation de concentration de l'anthranilate de méthyle ajouté et ce, sans affecter la croissance bactérienne. Il est reconnu que le PQS induit le gène de l'élastase *lasB* chez *P. aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1999). Il a été suggéré que la réduction de la quantité de PQS produite mène à une réduction de la production de l'élastase. L'activité de l'élastase à été déterminée en présence de l'anthranilate de méthyle. L'augmentation de la concentration de l'anthranilate de méthyle cause une diminution de l'activité de l'élastase produite par *P. aeruginosa* PAO1. L'activité de l'élastase en présence de 1.5mM de l'anthranilate de méthyle était comparable à la quantité minimale produite par la souche PAO-JP3, un double mutant *lasR*, *rhlR* incapable de synthétiser LasB (Pearson, Pesci et Iglewski, 1997). Ce résultat montre que l'analogue d'un précurseur d'un signal intercellulaire peut inhiber la synthèse de la molécule signal et causer une diminution de l'expression de facteurs de virulence contrôlée par la même molécule signal.



Acide anthranilique



Anthranilate de méthyle

Figure 1.12 Analogues de l'acide anthranilique. L'anthranilate de méthyle possède une structure similaire à l'AA, avec un groupement méthyle en position 2. La compétition causée entre les deux substrats cause une diminution de la production des HAQ et de l'expression des gènes de virulence reliés. D'après Calfee *et al.* (2001).

Chapitre II

Matériel et méthodes

2.1 Les souches utilisées

Lors des tests d'inhibition, la souche sauvage *Pseudomonas aeruginosa* PA14, un isolat clinique UCBPP-PA14, Rif^R (Rahme *et al.*, 1995) a été utilisée. Pour les tests concernant le régulateur transcriptionnel MvfR, *E. coli* a été transformé avec les plasmides pDN18 (*mvfR*), Tc^R et pLG12 (*pqsABCD*), Amp^R. Le plasmide pDN18 contient le promoteur *lacZ* permettant l'expression constitutive de *mvfR* (Déziel *et al.*, 2004). Le plasmide pLG12 contient un promoteur natif et requérant ainsi la présence de MvfR pour l'expression des gènes *pqsABCD* (Gallagher *et al.*, 2002). En ce qui concerne les tests sur TLC et les gels de protéines , les mutants *pqsA, pqsC* et *pqsD*, délétions non-polaires, ont été utilisés (Déziel *et al.*, 2004). De plus, les plasmides pLG12 et pLG14 (*pqsABC*) ont été transférés chez le mutant *pqsA*. De ce fait le mutant *pqsA* ne produisant aucun HAQ produira du HHQ suite à la présence du plasmide *pqsABCD* (tout comme chez le mutant *pqsE*). La présence du plasmide *pqsABC* multi-copies permet une surproduction des produits des gènes *pqsABC* mais sans production de HAQ. Le tableau 2.1 montre les souches et plasmides utilisés lors de l'expérimentation.

Tableau 2.1 Souches et plasmides utilisés lors de l'expérimentation

Souche / plasmides	Caractéristiques	Source ou référence
P. aeruginosa		
PA14	Isolat clinique UCBPP-PA14	Rahme *et al.* (1995)
PA14 *pqsA*-	Délétion non-polaire	Déziel *et al.* (2004)
PA14 *pqsC*-	Délétion non-polaire	Déziel *et al.* (2004)
PA14 *pqsD*-	Délétion non-polaire	Déziel *et al.* (2004)
E. coli		
DH5 alpha		
Plasmides	**Caractéristiques**	**Source ou référence**
pDN18-mvfR	promoteur constitutif, TcR	Déziel *et al.* (2004)
pLG12	*pqsABCD* [pUC18], AmpR	Gallagher *et al.* (2002)
pLG14	*pqsABC* [pUC18], AmpR	Gallagher *et al.* (2002)

2.2 Les milieux de croissance

Les souches ont été cultivées en milieu liquide Luria-Bertani (LB) (Becton, Dickinson and Compagny - Les laboratoires Difco) avec agitation à 240 rpm ou sur milieu solide LB agar à 1.5% à 30°C. Ces mêmes milieux ont été supplémentés avec des antibiotiques nécessaires pour la sélection et le maintien des vecteurs plasmidiques, la tétracycline (Tc) (1.5 µg/mL) et l'ampicilline (Amp) (2 µg/mL).

2.3 L'inoculation et la croissance des souches

À partir de cellules fraîches de 12 h sur Pétris, l'inoculation a été effectuée dans un tube de milieu liquide LB de 5 mL et remis en culture pendant 12 heures avec agitation rotative. Pour les expérimentations, les cultures ont été préparées le jour même dans des Erlenmeyer de 250 mL contentant 50 mL de milieu LB. L'inoculation de départ se fait à partir de la culture liquide de 12 h à une densité optique $D.O._{600nm}$ de 0.05. Le volume à ajouter était calculé à partir de la formule suivante :

Volume à ajouter = (D.O. voulue * volume à inoculer) / D.O. de l'innoculum

Lors des expérimentations comprenant l'acide anthranilique C14 (CDN isotopes, Pointe-Claire, Canada) l'ajout se fait à une concentration de 1 µCi par 50 mL de milieu de culture lorsque la densité optique se trouve entre 1.5 et 2.0. Il a été remarqué que l'ajout de PQS augmente la production en HAQ. Les cultures ont donc été supplémentées en PQSd4 à concentration de 10 ppm pour chaque culture de 50 mL. L'ajout s'est effectué à une D.O. entre 1.5 et 2.0. Les cultures ont été arrêtées à une D.O. d'environ 3.5 lors des différentes expérimentations ne comprenant pas le suivi de la courbe de croissance.

2.4 Les inhibiteurs

L'anthranilate de méthyle (MA), le 2-aminoacétophénone (2AA), l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl), l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F), l'acide N-

méthylanthranilate (NMAA), l'alcool 2-aminobenzylique (2ABA), l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl), l'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F), l'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F) et l'acide 2-nitrobenzoïque (2NB) proviennent de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) (Tableau 2.2). Les inhibiteurs ont été préparés à partir d'une solution mère de méthanol dont la concentration finale dans le milieu de culture était de 1.5 mM. L'utilisation du méthanol a permis de bien solubiliser les poudres tout en évitant la stérilisation par filtration. L'ajout des solutions ne dépasse pas 1% du volume de la culture soit 500 µL d'inhibiteur pour 50 mL de culture, pour éviter l'inhibition de la croissance bactérienne par le méthanol.

Tableau 2.2 Les inhibiteurs

Inhibiteurs	Abbréviations
Anthranilate de méthyle	MA
2-aminoacétophénone	2AA
Acide 6-chloro-2-aminobenzoïque	6Cl
Acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque	6F
Acide N-méthylanthranilate	NMAA
Alcool 2-aminobenzylique	2ABA
Acide 4-chloro-2-aminobenzoïque	4Cl
Acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque	4F
Acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque	5F
Acide 2-nitrobenzoïque	2NB

2.5 Les courbes de croissance

La croissance des souches, avec et sans inhibiteur, a été mesurée toutes les 5 heures sur une période de 35 heures. Pour éviter les prélèvements durant la nuit, une deuxième culture était inoculée à la fin de la première journée (voir le tableau 2.3). La croissance bactérienne a été mesurée par densité optique à une longueur d'onde de 600 nm au spectrophotomètre. Les densités optiques au temps 25 des séries 1 et 2 étaient comparées pour valider la concordance des séries. Les courbes de croissance ont été faites en triplicata.

Tableau 2.3 Les temps de prélèvements

Temps (heures)	0	5	10	15	20	25	30	35
Série 1	x	x	x			x	x	x
Série 2*				x	x	x		

* inoculation de la série 2, 15 heures avant son premier prélèvement

2.6 Les extractions au méthanol

Pour l'analyse des HAQ, des aliquotes de 500 µL ont été prélevées aux 5 heures lors de la courbe de croissance. Les échantillons ont par la suite été dilués dans un volume équivalent de méthanol contenant un standard interne, 20 mg/L de 5,6,7,8-tétradeutéro-2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline (Lépine *et al.*, 2003) et 1% d'acide acétique. Les échantillons ont été inversés pour bien solubiliser les HAQ dans le méthanol et centrifugés à 15,000 g pendant 15 min. Le surnageant a été transféré dans un vial de borosilicate et conservé à – 20°C.

2.7 Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CL/SM) ont été faites avec un CLHP d'Agilent HP1100 (Agilent Canada, Pointe-Claire) et d'un Quattro II de Micromass (Micromass Canada, Pointe-Claire). La colonne de chromatographie utilisée est une Agilent HP Eclipse XDB-C8 de type Luna Phenomenex de 4.5 x 150mm. Les échantillons passent par un gradient eau / acétonitrile avec une concentration constante de 1% d'acide acétique. La composition du solvant initial est de 80% d'eau pour 20% d'acétonitrile. Un changement linéaire des concentrations s'effectue sur 28 minutes avec au final 2% d'eau et 98% d'acétonitrile. Ces concentrations sont maintenues pendant 6 minutes additionnelles, le retour aux conditions initiales se fait en 1 minute et finalement la stabilisation pendant 3 minutes. La vitesse du courant est de 0.4m/min et passe par un « splitter » de marque Valco. Le volume d'échantillon injecté dans le spectromètre de masse est de 20µL. Les analyses ont été effectuées par électronébulisation en mode positif. Le voltage du capillaire était de 3kV et le voltage du cône à 21V. La température de la source était de 120°C. L'azote est utilisé comme gaz

nébulisateur et de séchage à un flot de 20 et 200mL/min, respectivement. Certains résultats ont été recueillis en mode « Selective Ion Detection » (SID). Un balayage entre 130 et 360 a permis la détection des ions pseudomoléculaires des HAQ. En mode positif, le PQS, HHQ et le N-oxide sont détectés à des m/z de 260, 244 et 260 respectivement. Les temps de rétention du PQS et du N-oxide diffèrent lors de la chromatograhie, 15.34 min pour le PQS et 16.47 pour le N-oxide.

2.8 La quantification

La quantification des HAQ a été faite en mesurant l'aire sous la courbe des chromatogrammes des ions pseudomoléculaires ainsi que du standard interne. Ce quotient a été multiplié par la concentration du standard interne ajouté. Les inhibiteurs ont aussi été quantifiés en établissant une droite standard des inhibiteurs respectifs. La concentration de l'inhibiteur est alors calculée en fonction de l'équation de la droite établie.

2.9 Les extractions au chloroforme

La mesure de la production de la pyocyanine s'est faite par l'extraction au chloroforme. Un échantillon de 1.5 mL de culture est récupéré et le surnageant est séparé des cellules par centrifugation à 15,000 g pendant 15 min. Un millilitre de surnageant est récupéré dans un tube à essai. L'extraction se fait par l'ajout de 500 µL de chloroforme et est répétée 2 fois. Les deux extractions sont mises en commun et 500 µL de HCl 0.2N est ajouté. La détection de la pyocyanine se fait à 520 nm (Essar *et al.*, 1990a).

2.10 Les extractions à l'acétate d'éthyle

L'extraction à l'acétate d'éthyle a été utilisée afin de récupérer toutes les molécules polaires produites par la souche PA14. Suite à une centrifugation de 15,000 g pendant 15 min, la fraction cellulaire et le surnageant ont été extraits séparément à l'acétate d'éthyle. Une deuxième extraction à été faite avec la culture bactérienne totale, surnageant et

cellules. Pour favoriser l'éclatement des cellules, une procédure de gel-dégel a été utilisée. Il s'agit de congeler les tubes à -80°C et de les dégeler au bain-marie à une température de 50°C. La lyse des cellules est visible par l'aspect visqueux de la culture ou du culot. Le volume d'acétate d'éthyle ajouté représente le tiers du volume à extraire. Une agitation vigoureuse est nécessaire pour bien mélanger la phase aqueuse et l'acétate d'éthyle pour récupérer les molécules polaires. Une centrifugation à 15,000 g a été nécessaire pour bien séparer les deux phases. La phase acétate d'éthyle a été récupérée dans un ballon et la phase aqueuse est à nouveau lavée à l'acétate d'éthyle, pour un total de 3 fois. Les trois extractions ont été mises en commun et ont été déshydratées au sulfate de sodium (Na_2SO_4). L'acétate d'éthyle a ensuite été évaporé au rotovapor, sous vide. Le transfert de la phase sèche s'est fait dans un vial de borosilicate en lavant le ballon avec 1 mL d'acétate d'éthyle, 3 fois. L'acétate d'éthyle a été évaporé au jet d'azote. La phase polaire est ensuite solubilisée dans les conditions de départ de la méthode de chromatographie en phase liquide, soit 500 µL d'une solution de 30% acétonitrile et 1% acide acétique. Les échantillons ont été analysés au HPLC couplé au spectromètre de masse en mode positif.

2.11 La chromatographie sur plaque de silice

Suite à l'extraction à l'acétate d'éthyle, l'extrait a été séparé par chromatographie sur couche mince (CCM) (Whatman). Pour la première dimension, un mélange de 90 % dichlorométhane et 10 % méthanol a été utilisé et en deuxième dimension, un mélange de 70 % acétate d'éthyle et 30 % d'hexane. La plaque de silice contient du F254, un indicateur fluorescent excitable à une longueur d'onde de 254nm. La plaque fluoresce partout à l'exception des endroits ou se trouvent les composes organiques. À 366 nm, la plaque n'est plus fluorescente, mais certains types de molécules émettent de la fluorescence à cette longueur d'onde, ce qui est le cas du PQS.

2.12 Le PhosphorImager

Pour révéler la radioactivité se trouvant dans les extraits séparés par chromatographie sur couche mince, le PhosphorImager a été utilisé. Il s'agit d'un système quantitatif d'image comprenant une plaque de phosphore photostimulable capable d'accumuler et produire l'image de la radioactivité présente dans l'échantillon.

2.13 Fractionnement cellulaire

Les cultures ont été centrifugées dans des tubes Falcon de 25 mL à 15,000 g pendant 30 min. afin de séparer le surnageant des cellules bactériennes. Par la suite les culots ont été resuspendus dans 1 mL de tampon K2HPO4 0.05M pH 7.5. L'inhibiteur de protéase PMSF, a été ajouté à la concentration finale de 10 µg / mL. Une extraction par gel-dégel a été effectuée pour ensuite centrifuger une première fois à 15,000 g pendant 10 min pour permettre de séparer les gros extraits bruts. Le surnageant a été récupéré et centrifugé à l'ultra-centrifugeuse pour séparer les membranes du cytoplasme à 40,000 g pendant 90 minutes avec le rotor 75Ti. Le surnageant a été récupéré et 20% en glycérol a été ajouté pour conserver au congélateur à –80°C. Le culot a été resuspendu dans 500 µL de tampon phosphate 0.05M à pH 7.5 additionné de glycérol à 20% et de Triton 1% pour solubiliser les membranes.

2.14 Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes

Certains des gènes de l'opéron *pqsA-D* présentent des similarités de séquences avec des protéines transporteuses de la fonction acyle (ACP). Celles-ci sont soupçonnées de fixer la fonction acyles des cétoacides, à l'aide d'un lien covalent faible. Les protéines cytoplasmiques et membranaires ont été séparées sur gel dans le but de trouver une ACP marquée, de par la présence de l'intermédiaire cétoacide couplé à l'acide anthranilique radioactif. Les conditions classiques d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS sont dénaturantes et peuvent donc arriver à briser le lien covalent. Les gels non dénaturants sont quant à eux sensibles aux processus pouvant altérer la charge

ou la conformation de la protéine. Il s'agit donc d'une excellente technique pour détecter des oligomères et agrégats covalents ou non-covalents ainsi que des liaisons protéine-protéines ou protéine-ligand. Ces gels sont faits en absence de SDS. Alors que la mobilité électrophorétique dépend de la masse moléculaire dans un gel SDS-PAGE, en conditions non dénaturantes, la mobilité dépend et de la charge et de son hydrodynamisme. Le gel de concentration 4% possède donc 0.1% de SDS, le gel de séparation 12% contient 0.1% en SDS ainsi que le tampon électrophorèse (Tris base 25 mM, glycine 250 mM, SDS 0,1%, pH 8.3) sous une tension de 35 V pour les 3 premières heures et sous une tension de 100 V pour les 12 heures suivantes (Laemmli, 1970; Madhavarao *et al.*, 2003) Pour le tampon de chargement des échantillons, on a omis l'utilisation de SDS, de mercaptoéthanol ainsi que le chauffage.

2.15 Coloration des protéines au bleu de coomassie

Les gels de polyacrylamides ont été incubés 60 min dans une solution de bleu de Coomassie (0,04 % (p/v) Coomassie brillant blue R, 40 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique glacial). Ensuite la décoloration a été faite dans une solution décolorante (25 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique glacial) jusqu'à transparence du gel et lavés abondamment à l'eau. Ensuite, les gels ont été incubés dans une solution de séchage (40 % (v/v) méthanol, 3 % (v/v) glycérol) à température pièce durant 2 heures et séchés sur des papiers buvards.

2.16 L'autoradiographie

L'autoradiographie est une méthode permettant la détection qualitative de matériel radioactif fixé sur un substrat solide. Cette matrice peut alors être mise en contact avec un film. Les radiations émises impressionneront alors le film vis-à-vis de leur lieu d'émission. Le développement subséquent du film permet de localiser le ou les endroits où est situé le traceur radioactif. Les films KodakBioMax MS ont été directement exposés à température de la pièce aux gels colorés au bleu de Coomassie pendant une période de 7 jours.

Chapitre III

Résultats

3.1 La sélection des inhibiteurs

Nous avons exposé *P. aeruginosa* PA14 à une série de neuf composés présentant des analogies de structures avec l'acide anthranilique en observant l'effet de ces composés sur la synthèse des HAQs. Dans un objectif à long terme de trouver un inhibiteur de la virulence de *P. aeruginosa* il nous faut également considérer l'effet de ses composés sur la croissance des bactéries de même que l'absence de dégradation de ces composés par les bactéries.

3.1.1 L'inhibition de la production des HAQ

Les différentes molécules choisies ont été ajoutées au milieu de culture et après inoculation analysées à différents intervalles directement dans le surnageant par spectrométrie de masse. L'effet de ces molécules a été mesurée au niveau des concentrations de trois HAQ, représentant trois des principales familles de HAQ, soit le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), le 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline (PQS) et le 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxide (Lépine *et al.*, 2004). Ces trois molécules possèdent une chaîne alkyle en position 2 composée de 7 carbones et sont les congénères les plus abondants de chaque famille.

Les figures 3.1 à 3.11 montrent la variation de la concentration en mg/L des HAQ dans le temps. Chez tous les contrôles, la production de HHQ est à son maximum au temps 5 h. (fig. 3.1) et diminue par la suite. Le PQS montre une concentration maximale au temps 25 h. et diminue ensuite graduellement. La concentration du N-oxide augmente tout au long de la croissance bactérienne (fig. 3.1).

Le tableau 3.1 compare l'inhibition de la production des HAQ suite à l'utilisation des différentes molécules inhibitrices. Cette comparaison est effectuée à des temps correspondants aux maximums de production retrouvés chez les contrôles pour les différentes familles de HAQ. Ces temps correspondent au temps 5 h. pour le HHQ, aux temps 20 ou 25 h. pour le PQS et au temps 35 h. pour le N-oxide.

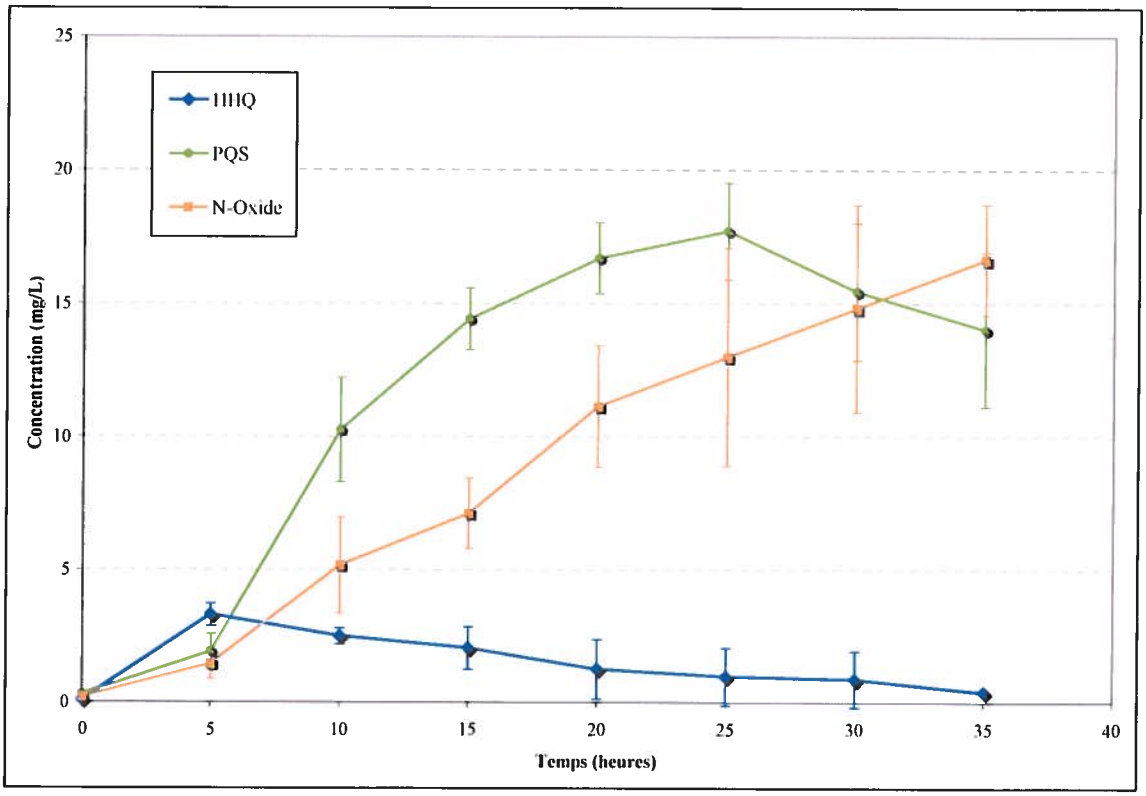


Figure 3.1 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 par la souche PA14.

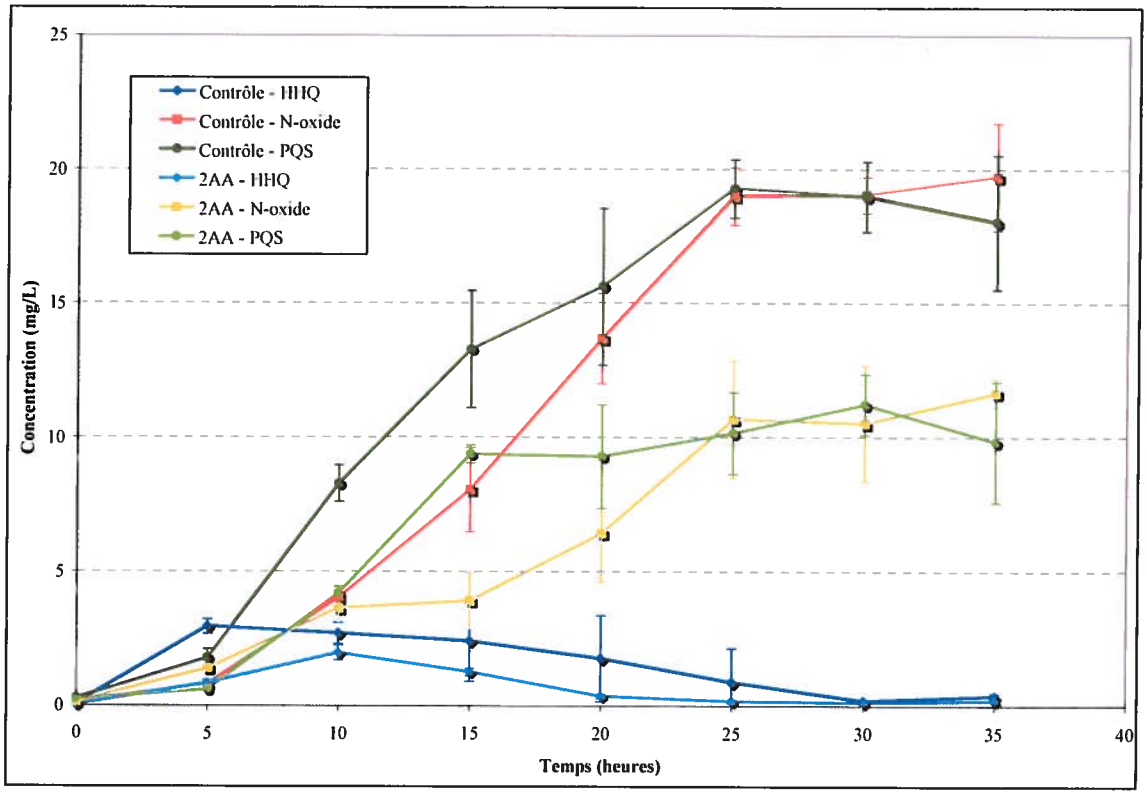


Figure 3.2 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM de 2-aminoacétophénone (2AA) dans le milieu de culture.

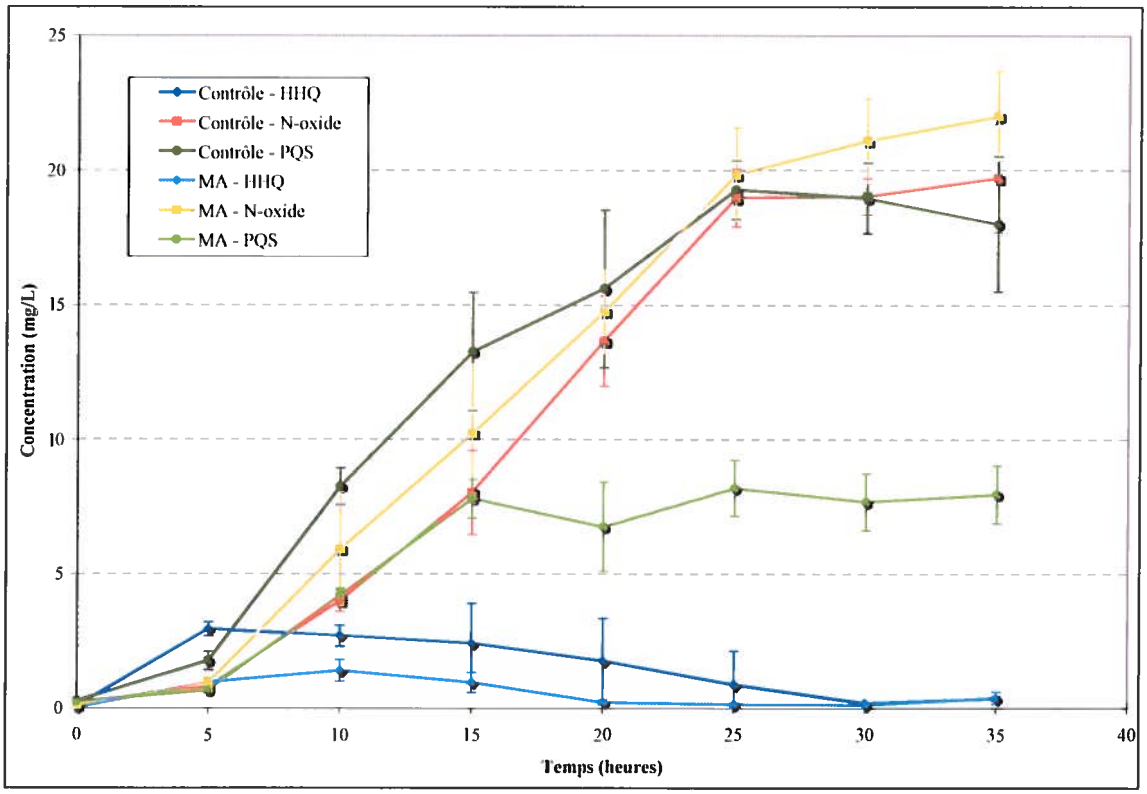


Figure 3.3 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'anthranilate de méthyle (MA) dans le milieu de culture.

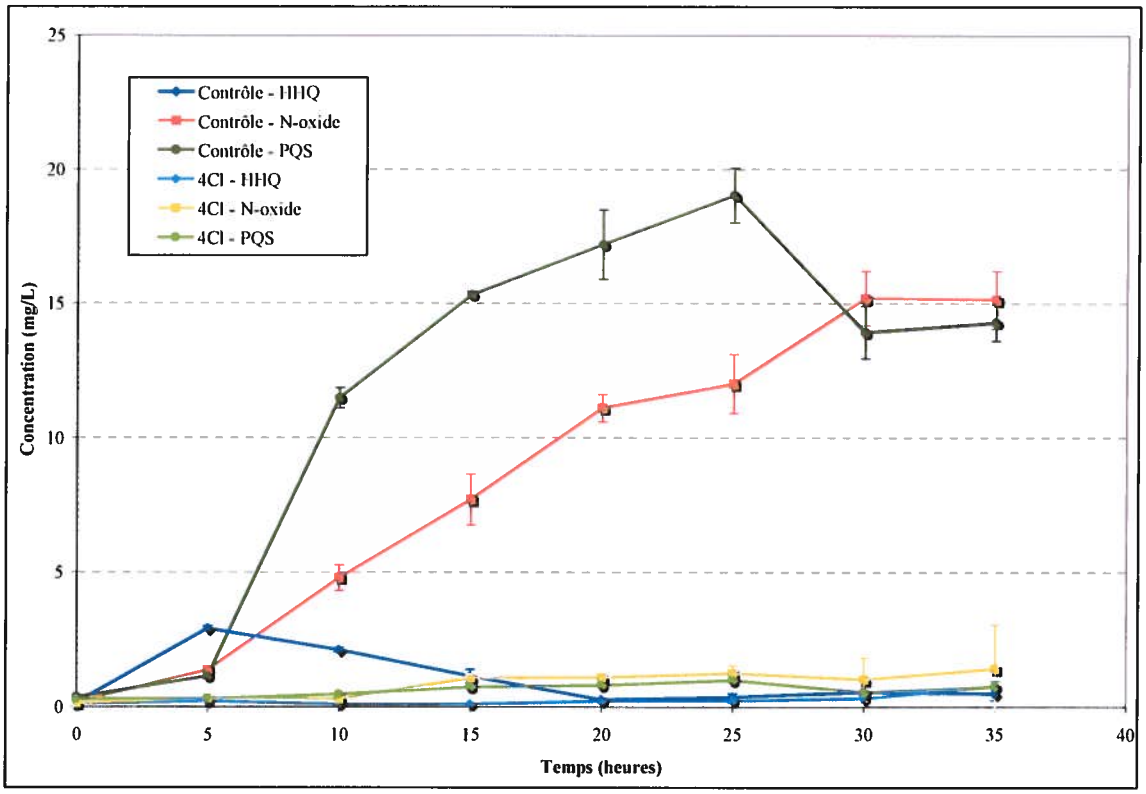


Figure 3.4 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl) dans le milieu de culture.

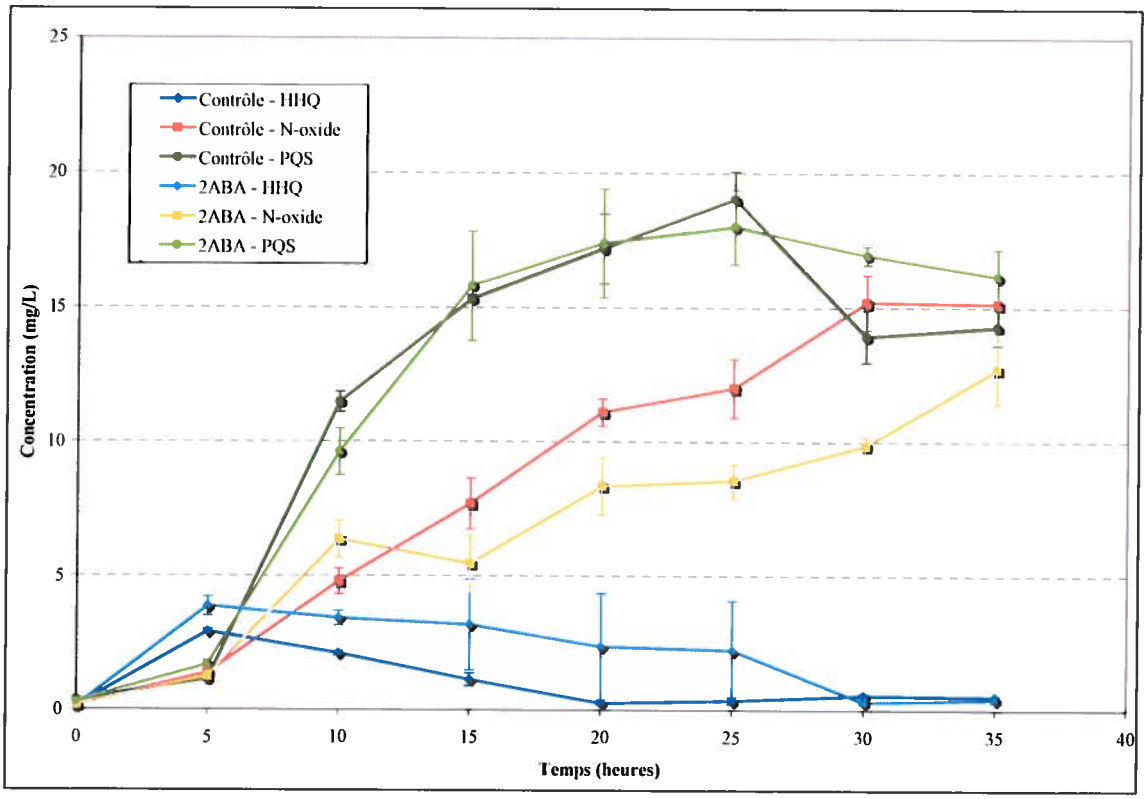


Figure 3.5 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'alcool 2-aminobenzylique (2ABA) dans le milieu de culture.

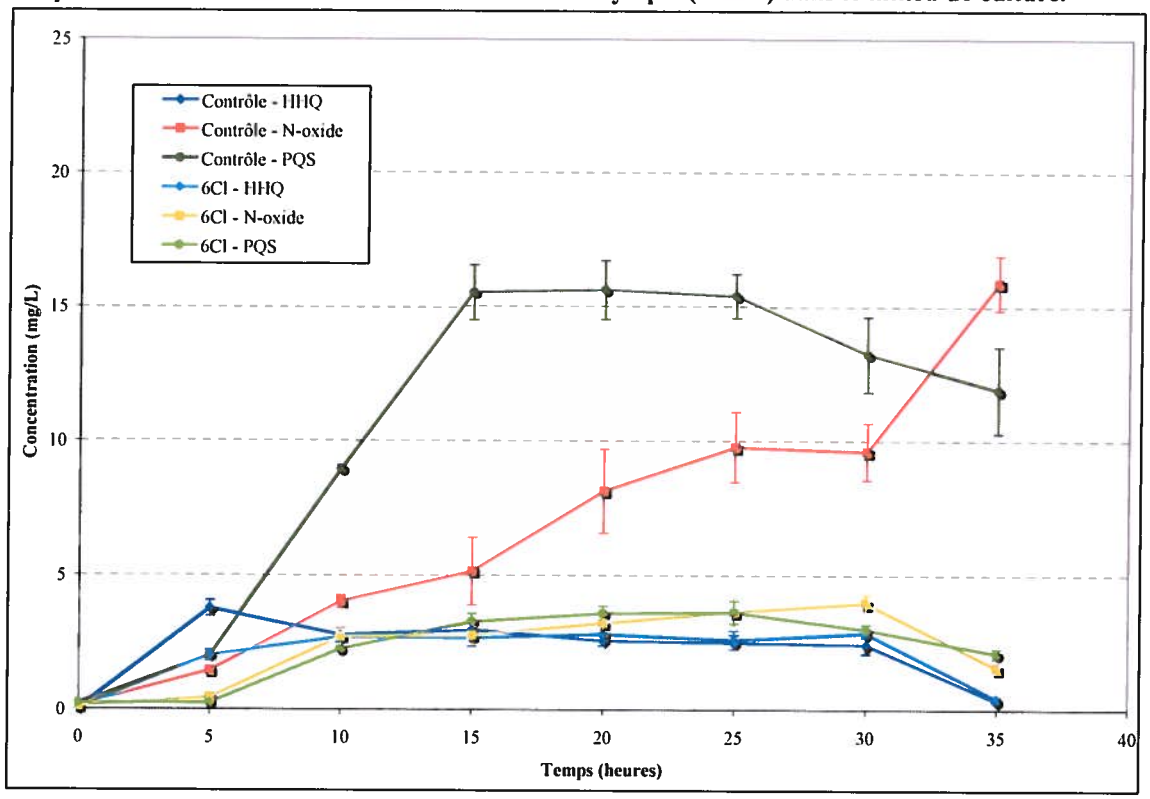


Figure 3.6 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl) dans le milieu de culture.

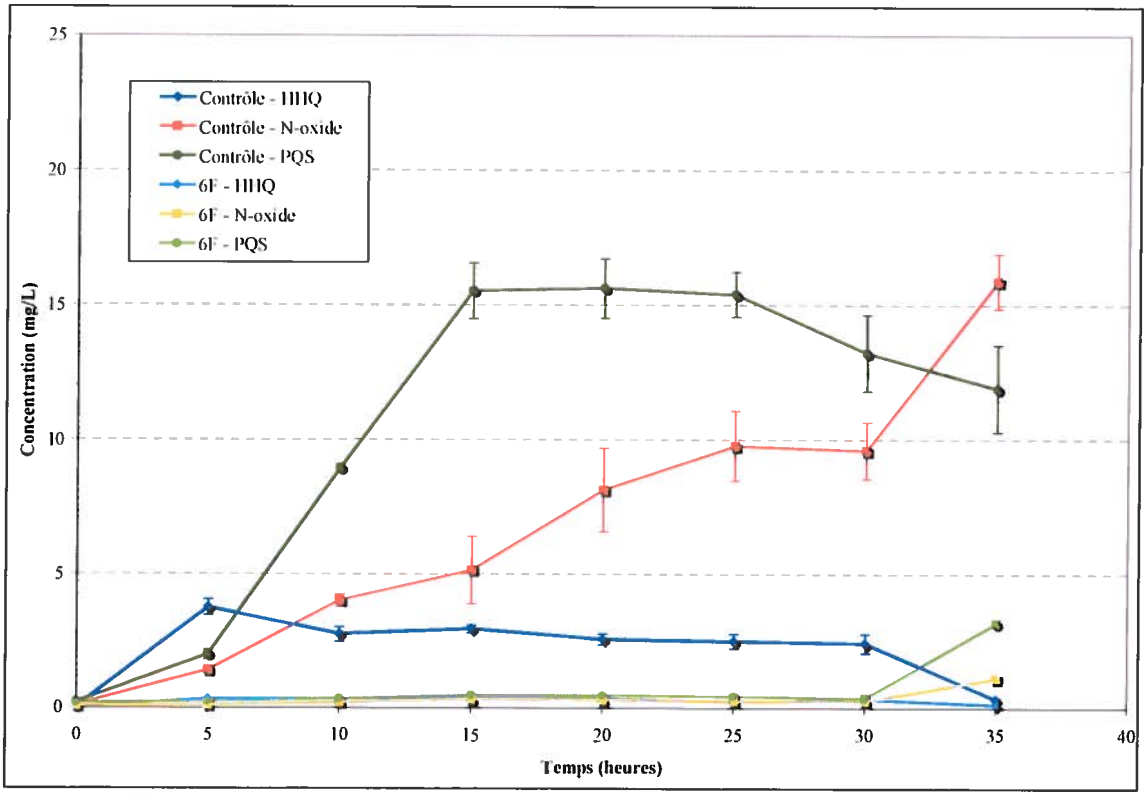


Figure 3.7 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F) dans le milieu de culture.

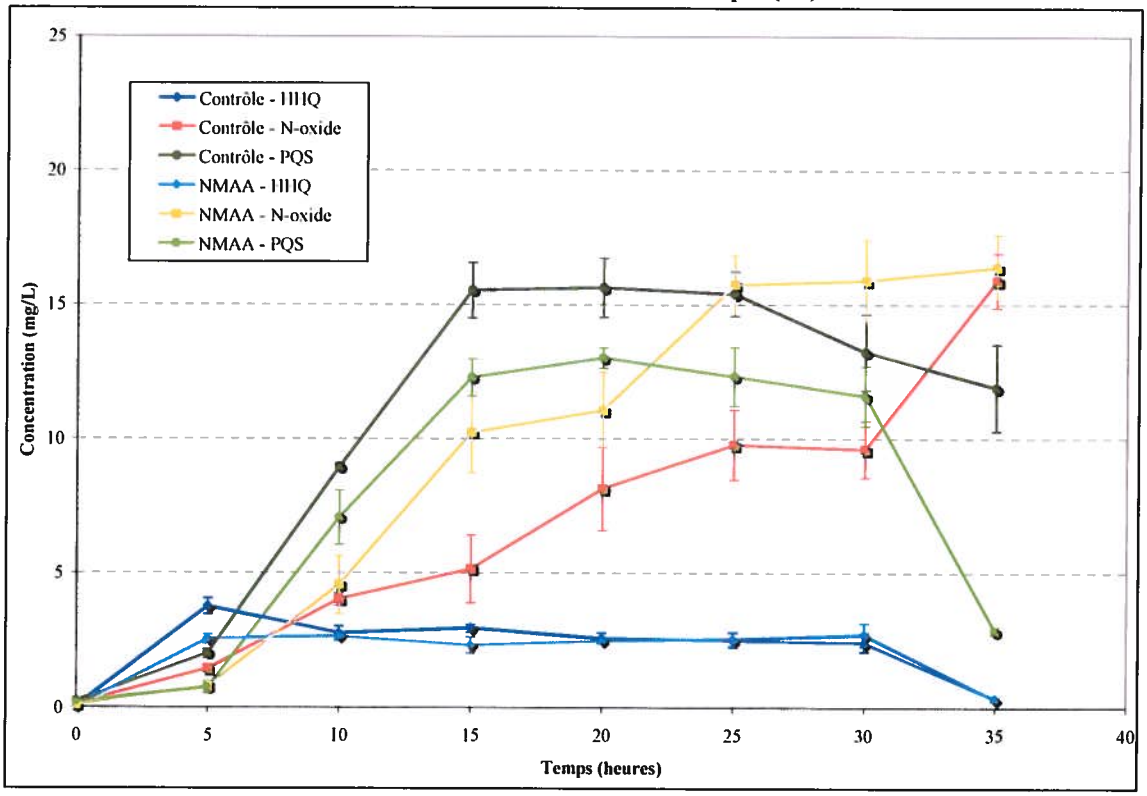


Figure 3.8 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide N-méthylanthranilique (NMAA) dans le milieu de culture.

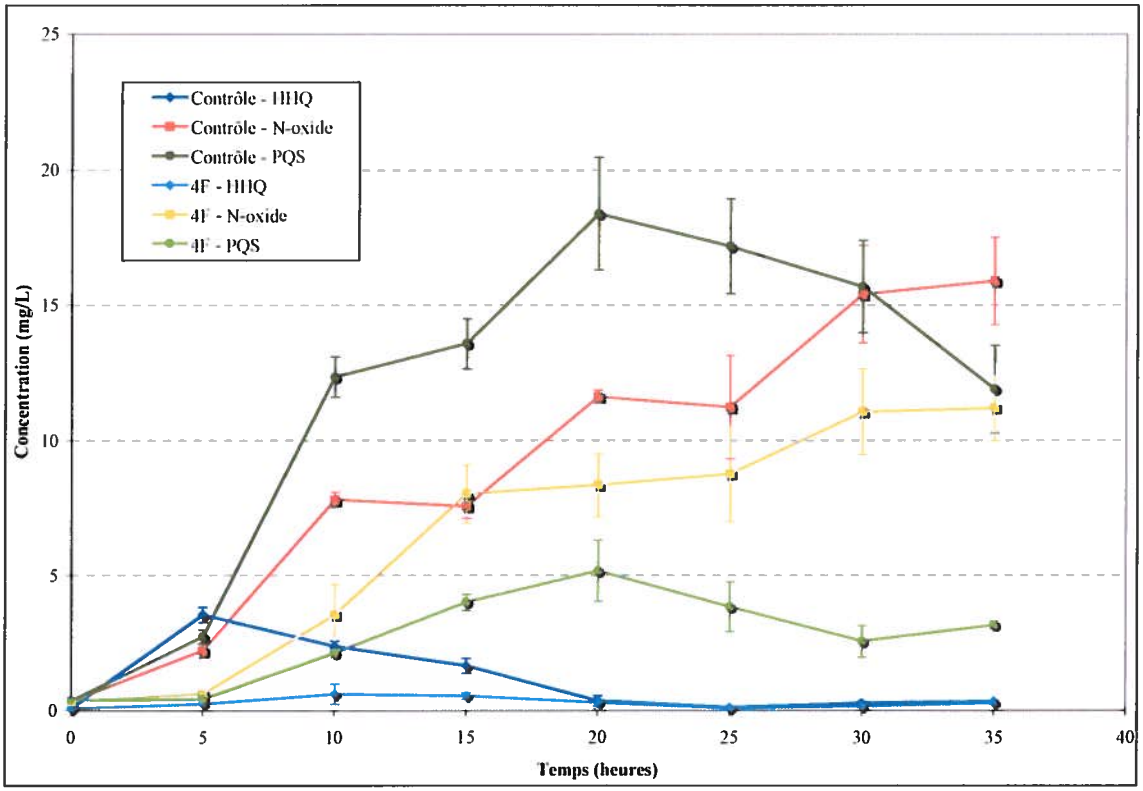


Figure 3.9 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F) dans le milieu de culture.

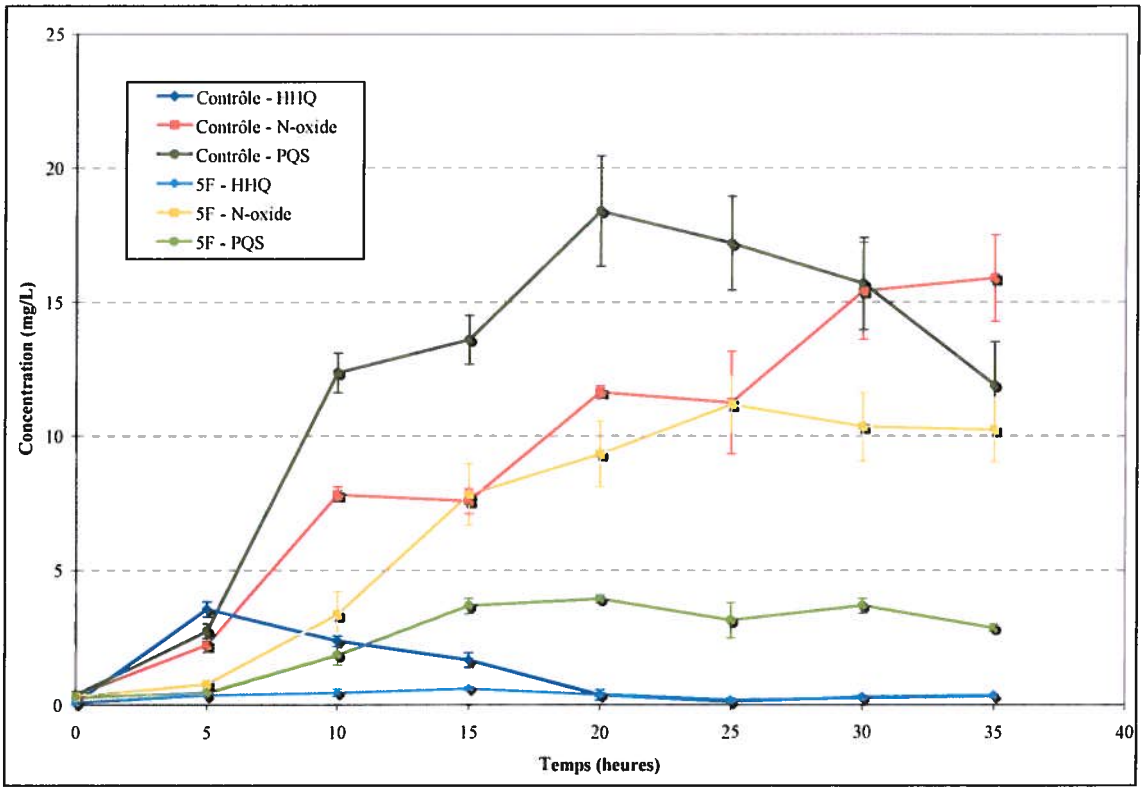


Figure 3.10 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F) dans le milieu de culture.

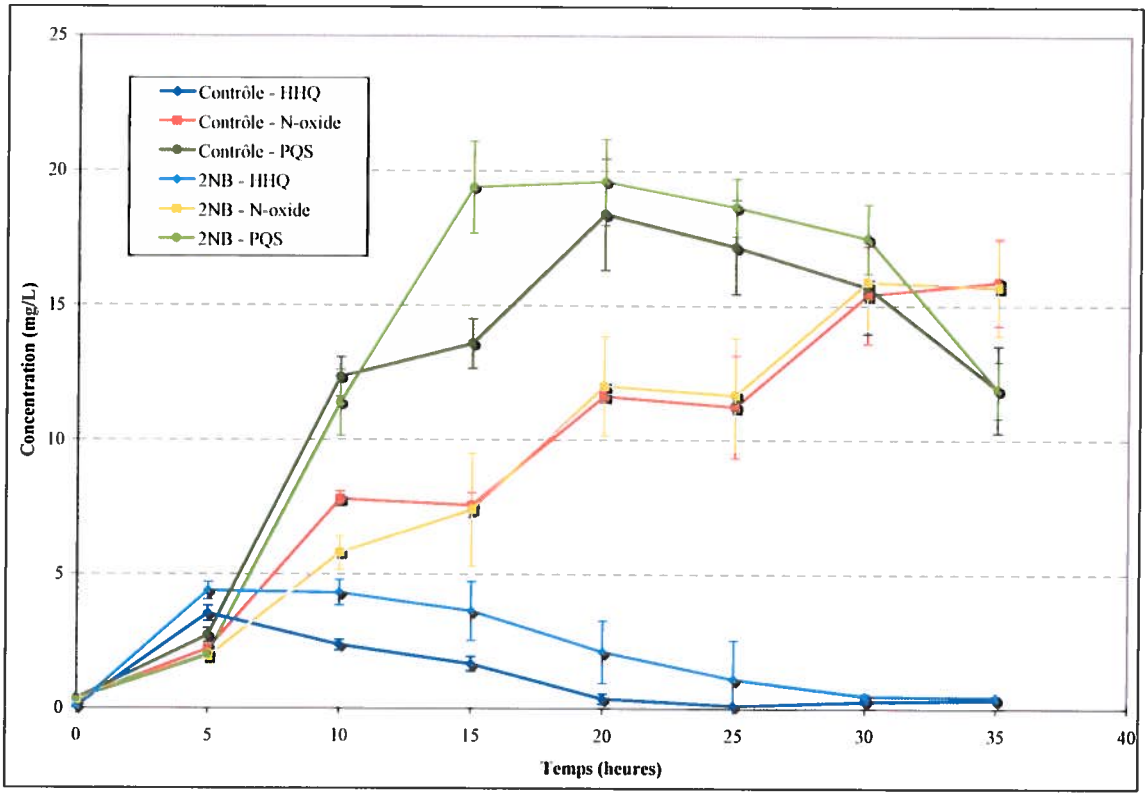


Figure 3.11 Suivi dans le temps de la production des HAQ C7 dans un contrôle de la souche PA14 comparé à l'addition de 1.5mM d'acide 2-nitrobenzoïque (2NB) dans le milieu de culture.

Tableau 3.1 Pourcentage de la réduction de la production des HAQ en présence de différents inhibiteurs.

	Réduction des HAQ (%) *		
Inhibiteurs	HHQ	PQS	N-oxide
2-aminoacétophénone (2AA)	33	42	41
Anthranilate de méthyle (MA)	52	57	12**
Acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl)	90	95	91
alcool 2-aminobenzylique (2ABA)	32**	5	16
Acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl)	46	76	90
Acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F)	90	97	97
Acide N-méthylanthranilate (NMAA)	32	20	3**
Acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F)	93	72	29
Acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F)	90	79	36
Acide 2-nitrobenzoïque (2NB)	24**	7	1

* Calculés après 5h pour le HHQ, 20-25h pour le PQS et 35h pour le N-oxide

** Augmentation de la production

Les inhibiteurs ont été testés par groupe à différents moments. De cette manière, le 2-aminoacétophénone et l'anthranilate de méthyle ont été testés la même journée et possèdent donc la même série de contrôle en triplicata. Tel est aussi le cas de l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque et de l'alcool 2-aminobenzylique; l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque, l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque et l'acide N-méthylanthranilate; l'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque, l'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque ainsi que l'acide 2-nitrobenzoïque.

Le 2-aminoacétophénone semble retarder la production du HHQ, le maximum de concentration passe de 5 à 10 h. La concentration en PQS et N-oxide est diminuée de 40% (fig. 3.2 et tableau 3.1). Avec l'anthranilate de méthyle, la concentration du PQS est diminuée de 57%, et de 52% pour ce qui est de la concentration en HHQ. L'anthranilate de méthyle augmente de 12% la concentration du N-oxide comparativement au contrôle, une augmentation non significative lorsque l'on considère les écart-types, (fig. 3.3 et tableau 3.1).

L'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque semble avoir un effet très marqué sur la production du HHQ, du PQS et du N-oxide, avec des réductions de plus de 90% de la concentration comparativement au contrôle (fig. 3.4 et tableau 3.1). L'alcool 2-aminobenzylique inhibe très peu la production du PQS et du N-oxide, avec des réductions de 5 et 16% respectivement. On remarque une augmentation du HHQ produit en présence de la molécule de 2ABA. Comparativement au contrôle dont la concentration en HHQ diminue de façon abrupte après 5 h, le 2ABA montre une baisse plus graduelle. Au temps 25 h. on retrouve 6 fois plus de HHQ que chez le contrôle. La concentration fini par chuter au temps 30 h. (fig. 3.5 et tableau 3.1).

Dans la prochaine série, on remarque qu'à la place d'un pic maximal de production, les contrôles présentent un plateau de production du PQS entre les temps 15 et 25 h. Pour ce qui est du HHQ, un plateau de production se trouve entre les temps 10 et 30 h. L'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque cause une réduction de 76% du PQS et de 90% du N-oxide. La production de HHQ demeure stable dans le temps à des concentrations équivalentes au

contrôle excepté au temps 5 h. où il y a une diminution de 46% de HHQ (fig. 3.6 et tableau 3.1). L'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque montre une inhibition presque totale des trois HAQ (fig. 3.7 et tableau 3.1) Une diminution de 90% du HHQ, de 97% du PQS et de 97% du N-oxide est en effet observée. L'acide N-méthyl anthranilique réduit de peu les maxima de production du HHQ et du PQS, soit de 32 et 20% respectivement, mais dans l'ensemble, la production en HHQ est semblable à celle du contrôle. La concentration finale du N-oxide au temps 35 h. est également semblable au contrôle, mais on remarque que tout au long de la croissance, les différents temps de prélèvements montrent une concentration plus élevée du N-oxide lorsque l'inhibiteur est présent (fig. 3.8 et tableau 3.1).

L'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque réduit de 93% la production du HHQ et la concentration du PQS de 72%. Le N-oxide semble être le HAQ le moins affecté par la présence de l'inhibiteur avec une diminution de 29% seulement (fig. 3.9 et tableau 3.1). L'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque diminue de 90% la production du HHQ. La concentration du PQS est abaissée de 79% et le N-oxide est diminué de 36% (fig. 3.10 et tableau 3.1). L'acide 2-nitrobenzoïque semble stimuler la production du HHQ, dont la présence reste mesurable jusqu'au au temps 30 h. comparativement au temps 20 h chez le contrôle. La production du N-oxide est tout à fait semblable avec ou sans inhibiteur. Pour ce qui est de la production du PQS, les courbes ne diffèrent que très légèrement (fig. 3.11 et tableau 3.1).

3.1.2 Les courbes de croissance

Il est important que la croissance bactérienne ne soit pas affectée suite à l'ajout d'un inhibiteur car si la croissance bactérienne était affectée, cela aurait un impact au niveau de la quantité de HAQ relâchés dans le milieu, ce qui compliquerait l'interprétation des résultats en termes d'inhibition intrinsèque de la synthèse des HAQ. La croissance d'un contrôle de PA14 est alors comparée à cette même souche mise en présence d'un inhibiteur. La mesure a été effectuée par spectrophotométrie aux 5 heures. Les figures suivantes, 3.12 à 3.15, montrent l'évolution de la densité optique des cultures dans le temps.

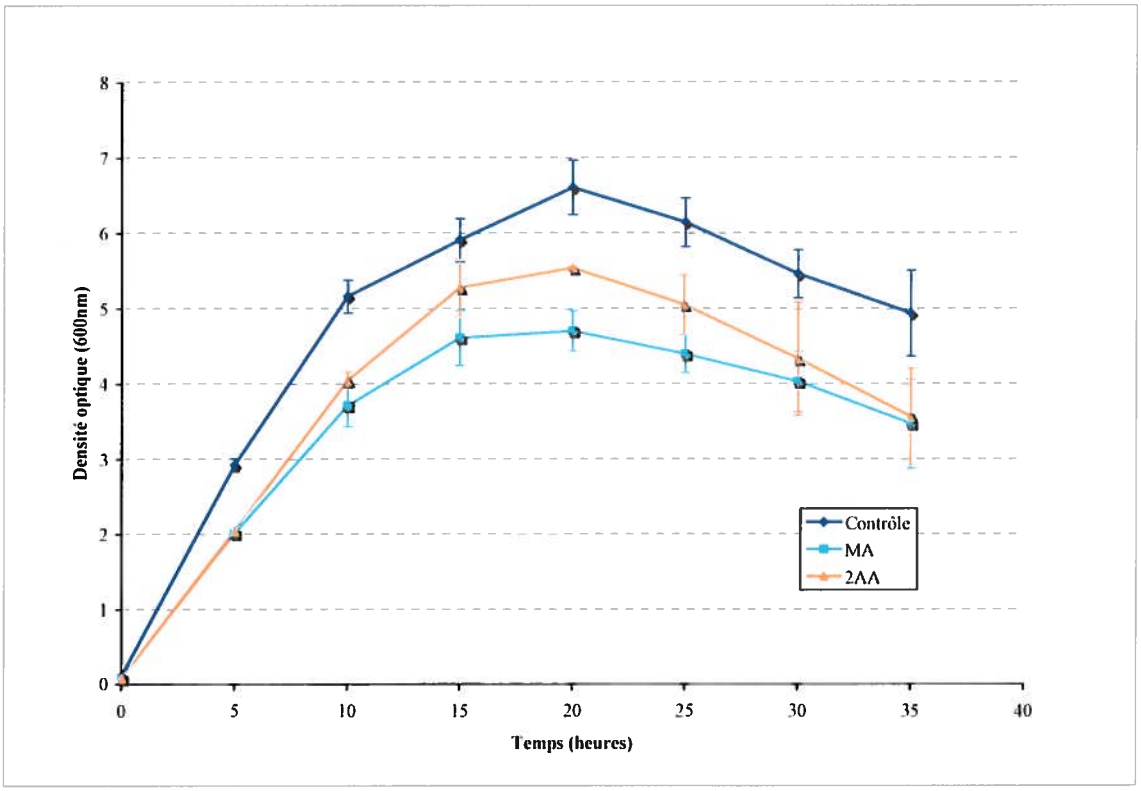


Figure 3.12 Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'anthranilate de méthyle (MA) et de 1.5 mM de 2-aminoacétophénone (2AA).

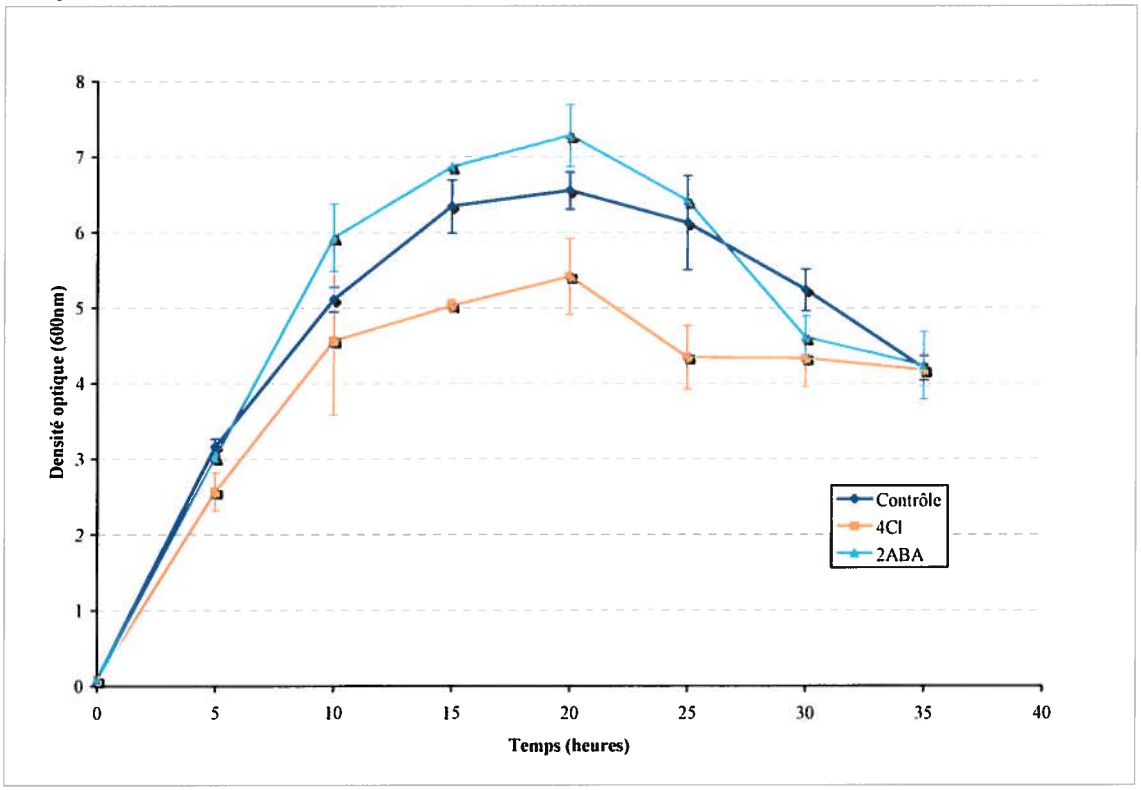


Figure 3.13 Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl) et de 1.5 mM d'alcool 2-aminobenzylique (2ABA).

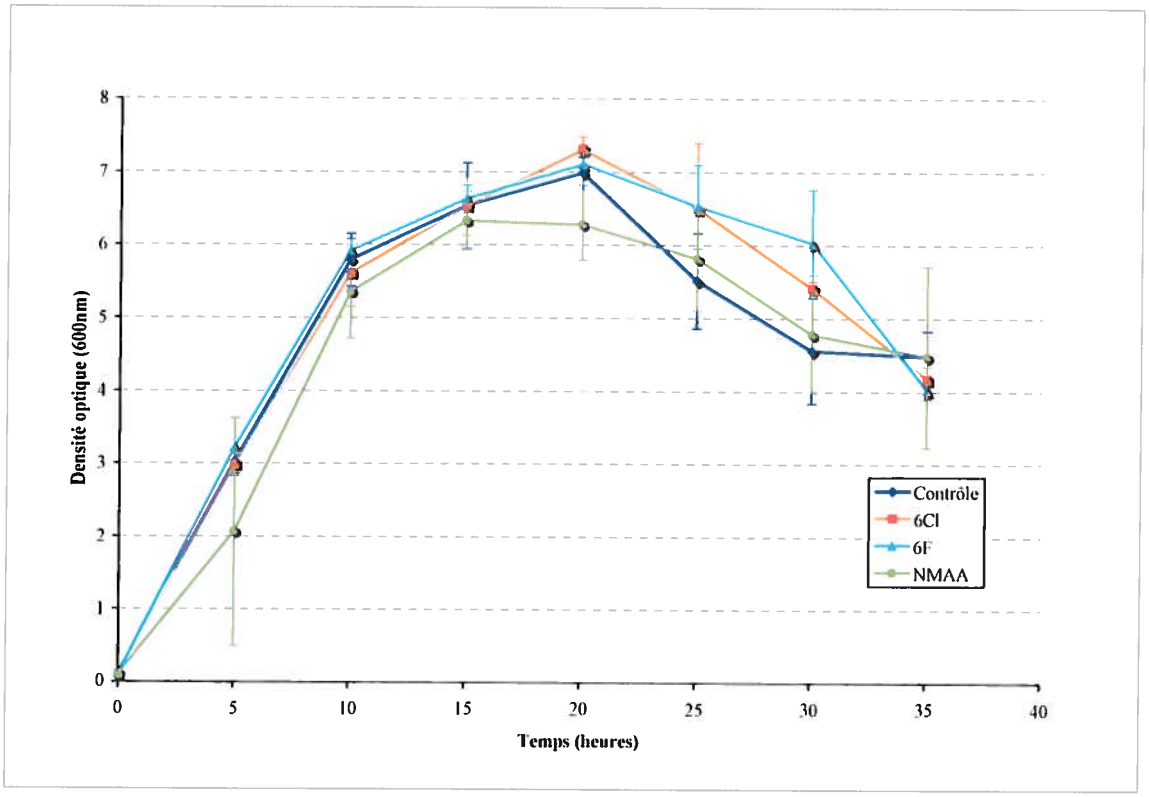


Figure 3.14 Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl), de 1.5 mM d'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F) et de 1.5 mM d'acide N-méthylanthranilique (NMAA).

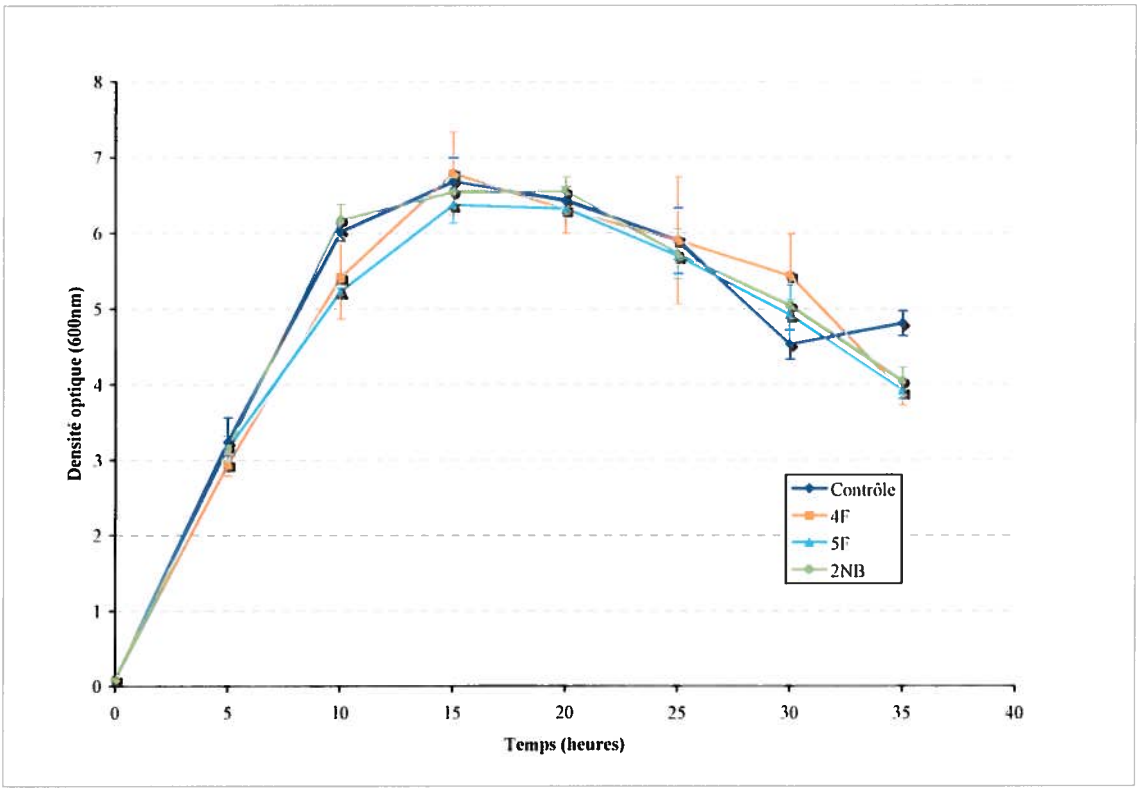


Figure 3.15 Courbes de croissance de la souche PA14 en présence de 1.5 mM d'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F), de 1.5 mM d'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F) et de 1.5 mM d'acide 2-nitrobenzoïque (2NB).

On peut remarquer dans les figures 3.12 à 3.15 que les inhibiteurs testés ont des effets différents sur la croissance bactérienne. L'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque, l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque, l'acide N-méthylanthranilique, l'alcool 2-aminobenzylique, l'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque, l'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque et l'acide 2-nitrobenzoïque ne montrent pas d'effet inhibiteur sur la courbe de croissance. L' anthranilate de méthyle, le 2-aminoacétophénone et l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque sont des produits qui empêchent la croissance normale d'une culture de PA14. La densité optique maximale obtenue chez les contrôles varie entre 6.55 et 6.99 aux temps 15 et 20 h.

3.1.3 La disparition des inhibiteurs dans le milieu

À l'aide de la spectrométrie de masse, la concentration des inhibiteurs a été suivie dans le temps afin de voir si les produits demeurent présents dans le milieu. La figure 3.16

montre le pourcentage relatif à la concentration initiale des inhibiteurs ajoutés dans le milieu de culture de PA14.

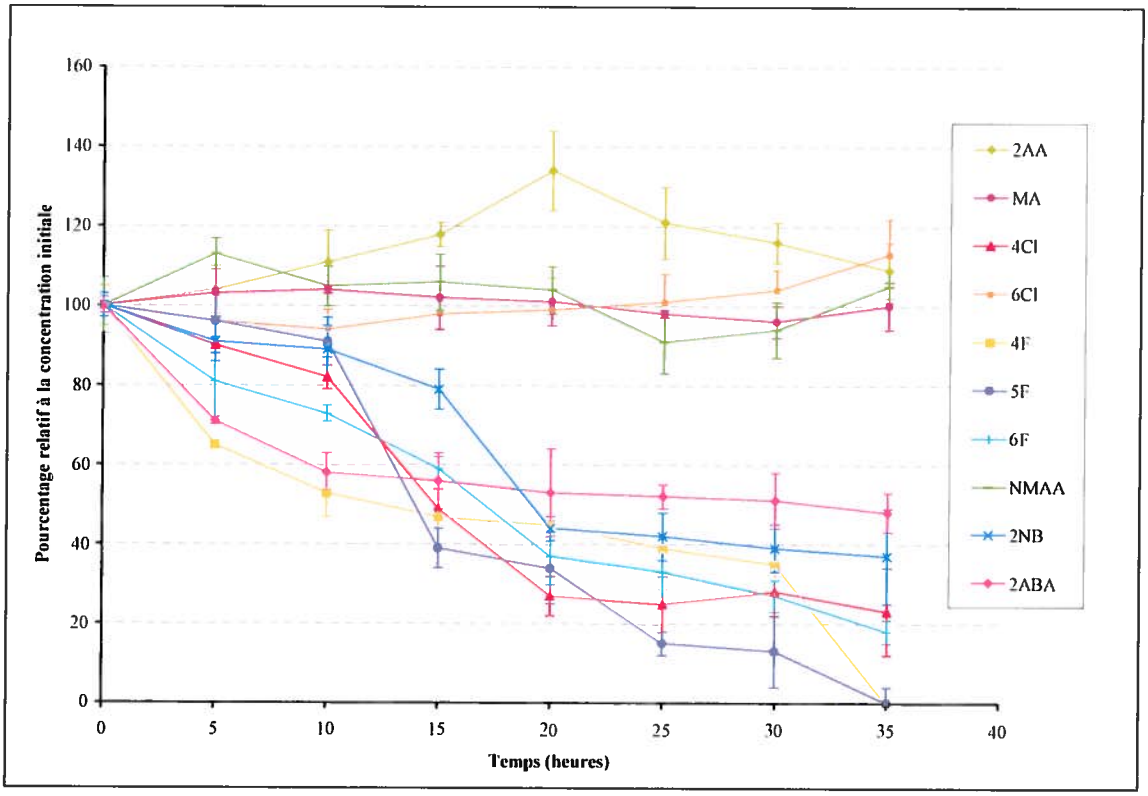


Figure 3.16 Disparition dans le temps des inhibiteurs ajoutés à 1.5 mM au milieu de culture LB de la souche PA14.

On remarque qu'une grande proportion des inhibiteurs testés semble se dégrader dans le temps. C'est le cas l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, de l'acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque, de l'acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque, de l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque, de l'acide 2-nitrobenzoïque et de l'alcool 2-aminobenzylique. Les composés demeurant stables sont l'anthranilate de méthyle, l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque, l'acide N-méthylanthranilique et le 2-aminoacétophénone. Cette dernière molécule voit sa concentration augmenter pendant les 20 premières heures de la culture pour ensuite redescendre.

Parmi les résultats obtenus, il est maintenant possible de sélectionner le ou les inhibiteurs les plus performants. Le but est de trouver un inhibiteur n'ayant pas d'effet sur la croissance, qui ne se dégrade pas et dont l'inhibition est efficace. Le résumé de ces

résultats en fonction de ces 3 critères de sélection se retrouve dans le tableau 3.2. On y retrouve le rapport de la densité optique maximale obtenue pour les cultures contenant les inhibiteurs comparativement aux contrôles. Dans la deuxième colonne se trouve le pourcentage résiduel des inhibiteurs détectés dans le milieu après 35 heures de culture. Finalement, le pourcentage d'inhibition a été calculé en fonction de la moyenne de la production des 3 différents groupes de HAQ quantifiés comparativement aux contrôles.

Tableau 3.2 Résultats des critères de sélection des inhibiteurs potentiels.

Inhibiteurs	Ratio DO I/C*	% résiduel	% inhibition
2-aminoacétophénone (2AA)	0.84	109	39
Anthranilate de méthyle (MA)	0.71	100	36
Acide 4-chloro-2-aminobenzoïque (4Cl)	0.83	23	92
alcool 2-aminobenzylique (2ABA)	1.11	48	7
Acide 6-chloro-2-aminobenzoïque (6Cl)	1.05	113	71
Acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (6F)	1.02	18	95
Acide N-méthylanthranilate (NMAA)	0.90	105	17
Acide 4-fluoro-2-aminobenzoïque (4F)	1.02	0	65
Acide 5-fluoro-2-aminobenzoïque (5F)	0.95	0	68
Acide 2-nitrobenzoïque (2NB)	0.98	37	3

* Inhibiteur/contrôle

L'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque est une molécule efficace à 92% dans l'inhibition des HAQ. Son pourcentage résiduel dans le milieu est cependant faible à 23%, et l'influence sur la croissance bactérienne se fait un peu ressentir, avec un rapport de 0.83 (tableau 3.2). Malgré ces deux derniers critères, l'étude du 4Cl sera poursuivie à cause des excellents résultats d'inhibition obtenus. L'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque est aussi retenu. Malgré son taux résiduel très faible, 18%, cette molécule n'agit pas sur la croissance bactérienne et son potentiel d'inhibition des HAQ est excellent (tableau 3.2). Avec un pourcentage d'inhibition des HAQ se situant à 71%, l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque influence très peu la croissance bactérienne et sa dégradation ne semble pas avoir lieu (tableau 3.2).

3.2 Le mode d'action des inhibiteurs

3.2.1 La cinétique de production de l'acide anthranilique

Un des mécanismes possibles d'inhibition de la synthèse des HAQ par les différents composés testés serait qu'ils puissent diminuer la production de l'acide anthranilique. Afin d'étudier cette possibilité, la cinétique de production de l'AA a été suivie lorsque la souche PA14 est mise en culture avec un inhibiteur.

La figure 3.17 montre bien qu'il semble y avoir accumulation transitoire d'AA aux environs du temps 5h lorsque la souche est en présence des différents inhibiteurs. En comparaison, le contrôle ne montre d'accumulation d'AA qu'à la fin de la période d'incubation, entre les temps 10 et 24 h.

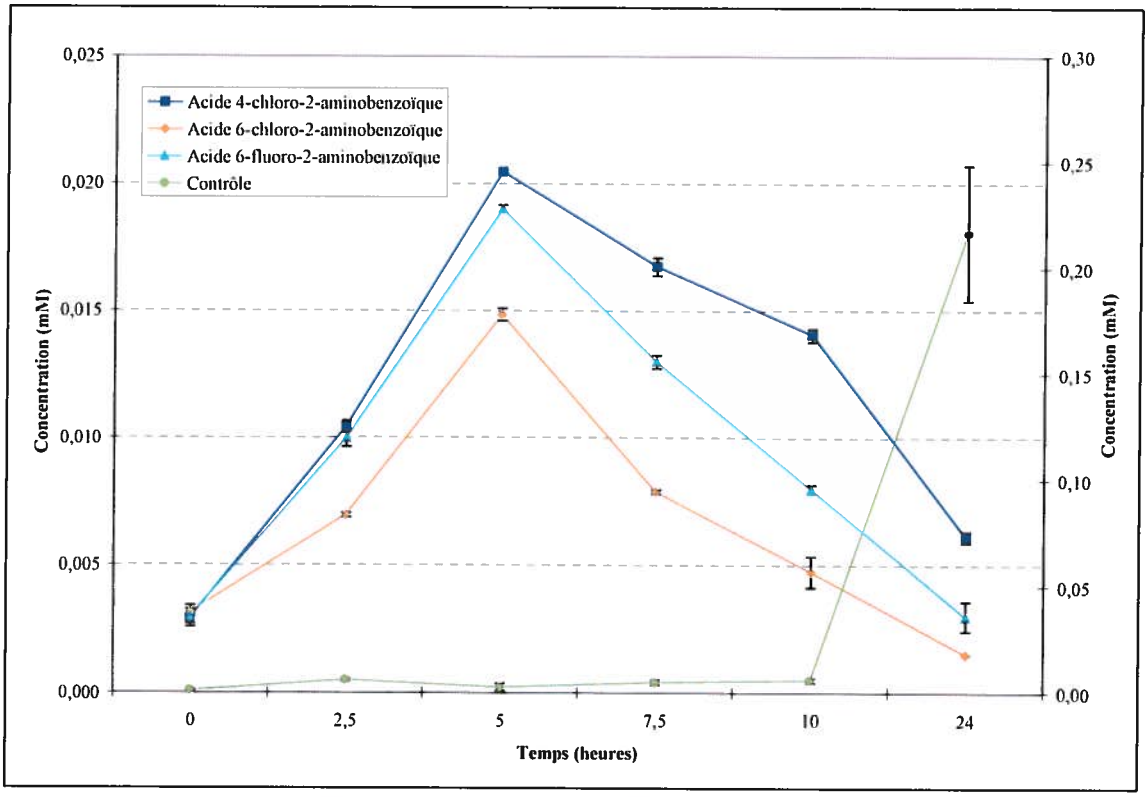


Figure 3.17 Cinétique de production de l'acide anthranilique de PA14 en culture avec des inhibiteurs.

Pour fin de comparaison, la cinétique de production en AA d'un mutant *pqsA* a été suivie. La figure 3.18 montre qu'il y a accumulation d'AA chez le mutant *pqsA* et non dans la souche sauvage PA14. En comparant les figures 3.17 et 3.18, les maxima d'accumulation de l'AA sont comparables dans leurs concentrations, entre 0.015 et 0.020 ppm, et dans le temps, entre 5 et 7 heures.

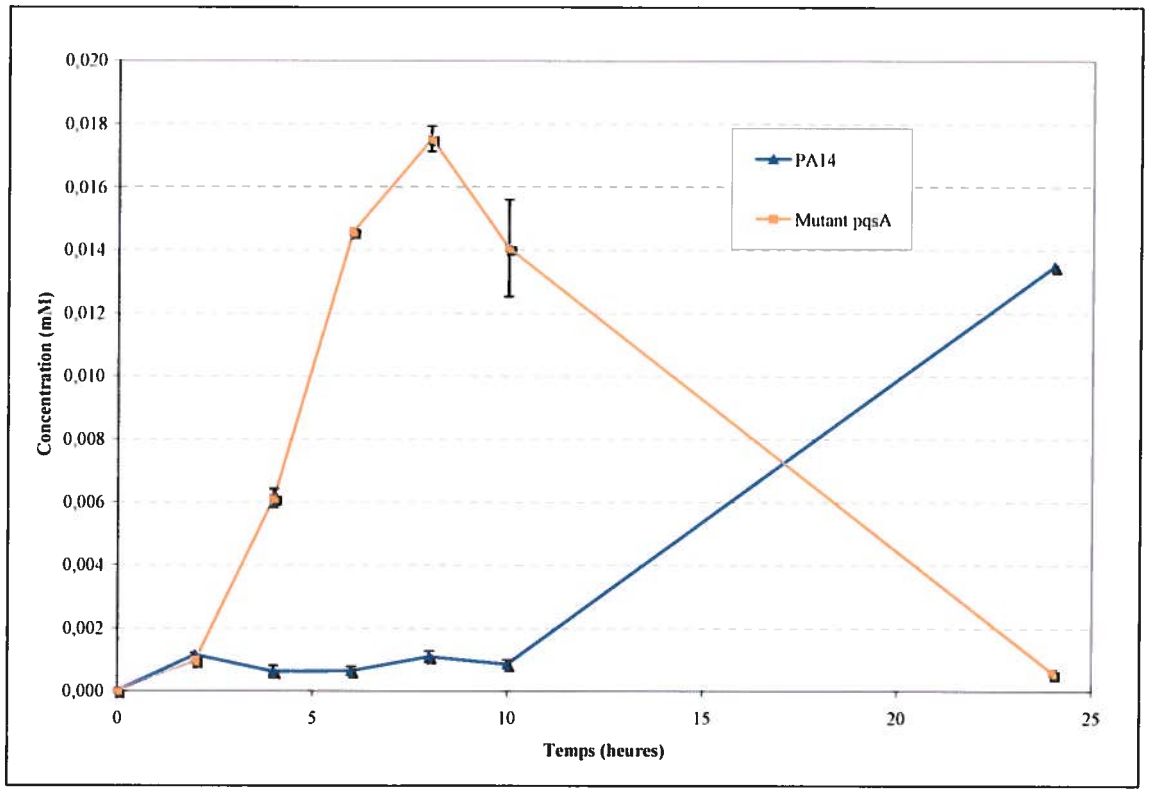


Figure 3.18 Cinétique de production de l'acide anthranilique chez un mutant *pqsA* et de la souche sauvage PA14.

3.2.2 Le test de compétition

Ayant établi que la production d'AA n'est pas réduite en présence des inhibiteurs nous avons voulu vérifer si *pqsA* était bien la cible de ces composés. Pour répondre à cette question, un test de compétitivité a été effectué. Si le 4Cl, le 6Cl et le 6F qui ont des structures chimiques semblables à l'AA, compétitionnent réversiblement avec ce dernier pour le site actif de *pqsA*, l'inhibition de la synthèse des HAQ devrait être partiellement levée par l'addition d'AA exogène. Afin de déterminer quelles concentrations d'AA

devaient être utilisées, nous avons tout d'abord étudié l'effet de concentration croissante d'AA sur la croissance de PA14.

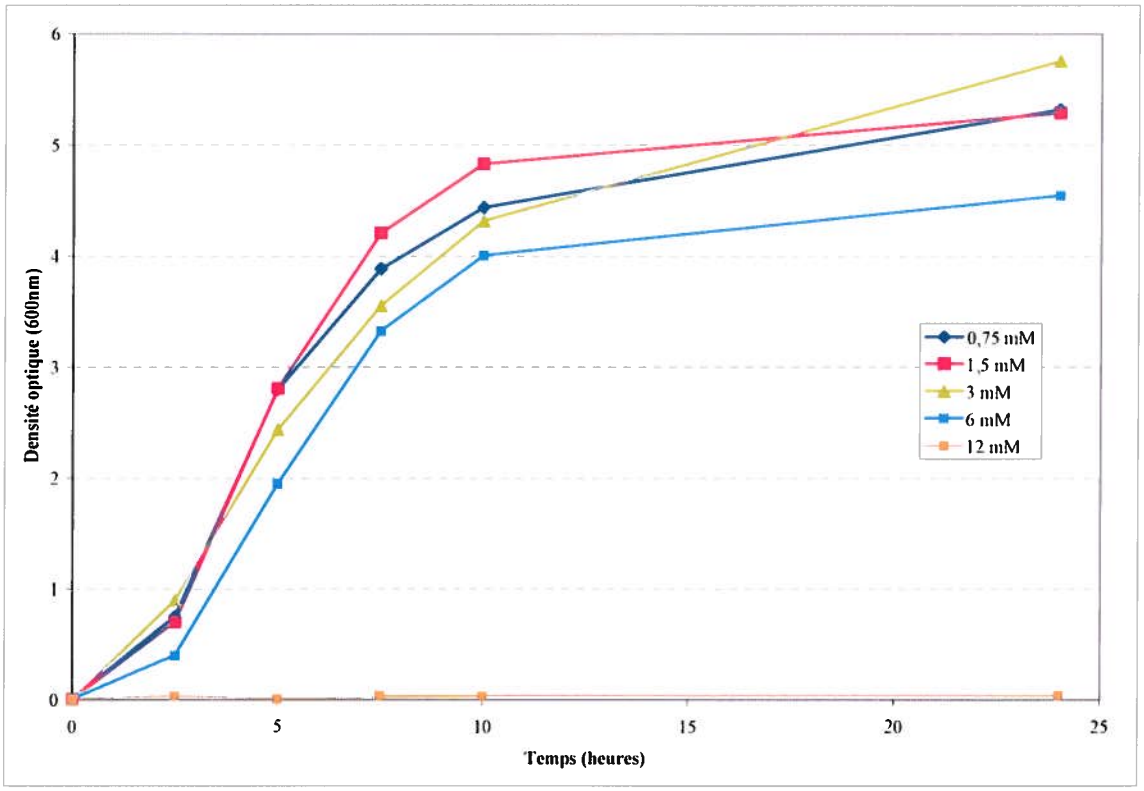


Figure 3.19 Courbes de croissance d'une culture de PA14 mis en présence de différentes concentrations d'acide anthranilique.

Il se dégage de la figure 3.19 que des concentrations de plus de 3 mM d'AA ont un effet inhibiteur sur la croissance de *P. aeruginosa* PA14. Dès 6 mM, on remarque que la densité optique de la culture est plus faible au temps 24 heures comparativement aux concentrations 0.75, 1.5 et 3 mM. À 12 mM, la concentration est beaucoup trop forte et inhibe totalement la croissance de la souche PA14.

Les inhibiteurs ont donc été ajoutés au milieu de culture à une concentration de 1.5 mM et l'AA a été ajouté à des concentrations finales, de 0.75 mM à 3 mM. La production des HAQ a ensuite été mesurée à partir de cultures obtenues après 24 h de croissance.

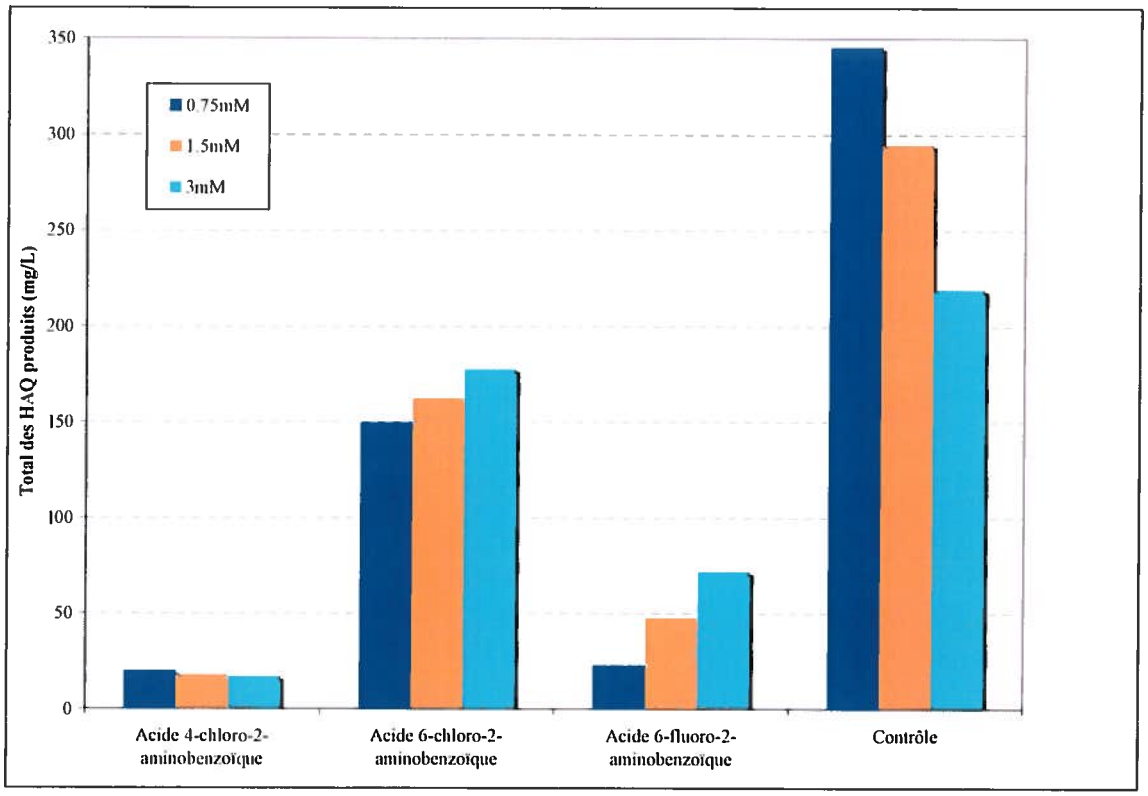


Figure 3.20 Production des HAQ totaux en présence des inhibiteurs et de l'addition de trois différentes concentrations d'acide anthranilique.

Le test de compétition (fig. 3.20) montre que plus la concentration de l'acide anthranilique augmente, plus il y a de HAQ produits. C'est le cas de l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque et de l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque. Quant à l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, l'effet de cet inhibiteur ne semble pas être influencé par l'augmentation de la concentration de AA. Pour ce qui est du contrôle, on voit une diminution de la concentration des HAQ avec une augmentation de la concentration en acide anthranilique.

3.2.3 La production de la pyocyanine

La pyocyanine est un composé de couleur bleutée produit par PA14. Ce produit est considéré comme un facteur de virulence contrôlé par le système de quorum sensing. Afin de vérifier dans quelle mesure nos inhibiteurs de la synthèse de HAQ ont un effet sur le quorum sensing, et potentiellement sur la virulence, la production de pyocyanine de cultures de la souche PA14 dans un milieu LB a été mesurée en présence de ces

inhibiteurs. Pour s'assurer que la détermination spectrophotométrique de la pyocyanine ne subisse pas d'interférences causées par d'éventuels produits de dégradations colorés des inhibiteurs, une extraction préalable au chloroforme a été effectuée. En effet, bien que lors de l'addition d'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque ainsi que d'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque, la même couleur bleutée apparaît que lors de la croissance de PA14, dans le cas de l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, le milieu de culture demeure jaune pour ensuite devenir brunâtre.

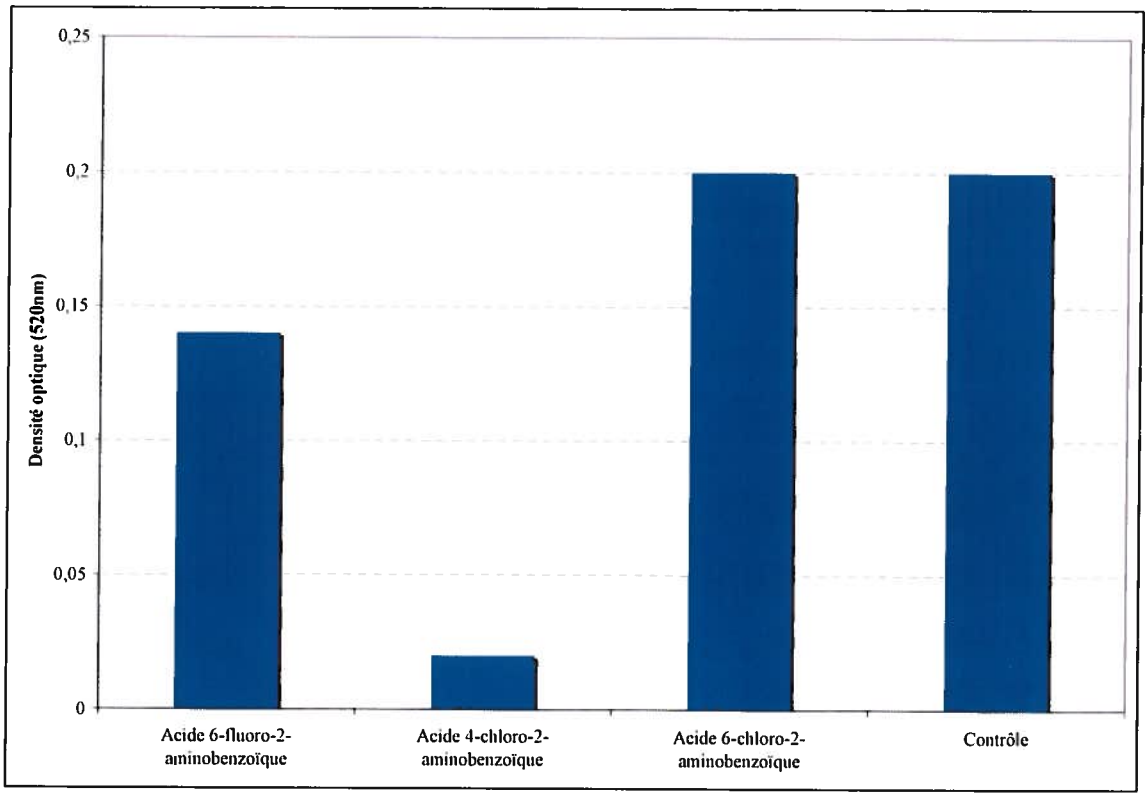


Figure 3.21 Extraction au chloroforme de la pyocyanine produite après 24 heures de croissance de PA14 en présence de différents inhibiteurs.

Après 24 h. en culture, les densités optiques de différentes cultures de la souche PA14 en présence des inhibiteurs à 1.5 mM sont de 4.17 pour le 4Cl, 4.26 le 6Cl et de 4.03 pour le 6F. La culture contenant l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque produit autant de pyocyanine que le contrôle. L'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque réduit de 30% la production en pyocyanine. Pour ce qui est de l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, il diminue grandement la production de la pyocyanine et ce jusqu'à 90%.

3.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR

En plus d'un effet direct des inhibiteurs sur le quorum sensing via la diminution de la production des HAQ, un autre mode d'action de ces composés peut être envisagé, via une diminution de l'activité du régulateur transcriptionel des opérons *phnAB* et *pqsABCDE* qui sont responsables de la synthèse des HAQ. Le régulateur transcriptionnel de ces deux opérons est MvfR. Ce régulateur présente des analogies de structures avec les régulateurs de type LysR (Schell, 1993), dont l'activité est régulée par le produit des gènes qu'ils contrôlent. Un mutant *mvfR* n'a pas d'opéron *phnAB* et *pqsABCDE* actif, ne produit pas de HAQ, produit moins de pyocyanine et est moins virulent que le PA14 sauvage (Cao *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; McGrath, Wade et Pesci, 2004). Il a été remarqué que l'ajout de PQS semblait activer le régulateur transcriptionnel MvfR (Xiao *et al.*, 2006). Il se pourrait donc que ce régulateur possède un ou des ligands particuliers, possiblement PQS et/ou le HHQ qui sont les produits des gènes contrôlés par MvfR. Afin d'étudier la régulation de l'activité de MvfR vis-à-vis la production des HAQ, la production de ces composés dans un système d'expression hétérologue a été effectuée.

Nous avons utilisé une souche d'*Escherichia coli*, dans laquelle les plasmides pDN18 (*mvfR*) et pLG12 (*pqsABCD*), dont l'expression est constitutive, ont été insérés. Cette souche nous a été fournie par le laboratoire du Dr. Rahme. Les HAQ n'étant pas produits par *E. coli.*, les risques de rencontrer un système interférant pour un ligand potentiel de MvfR sont moins grands. Avec le plasmide *pqsABCD*, *E. coli* ne devrait pouvoir produire que des congénères de la famille du HHQ seulement, cette bactérie ne possédant pas les enzymes PqsH et PqsL essentiels à la production des congénères des familles du PQS et du N-oxide (Gallagher *et al.*, 2002; Lépine *et al.*, 2004). Afin de visualiser l'effet du HHQ du PQS sur l'activité de MvfR la production des congénères du HHQ sera mesurée dans des cultures supplémentées en PQSd4 et en HHQd4.

Tout d'abord, un suivi de la croissance et de la production en HHQ chez *E. coli* pDN18+pLG12 a été fait. Des aliquotes ont été prélevées toutes les heures pendant 10 h

et ensuite au point 24 h. Le suivi de la production en HAQ s'est fait aux temps 4, 6, 8, 10 et 24 h. Le milieu de culture a aussi été supplémenté avec de l'acide anthranilique non marqué pour maximiser la production de HHQ au cas où l'AA se trouvait en quantité limitante chez *E. coli* pour fabriquer des HAQ.

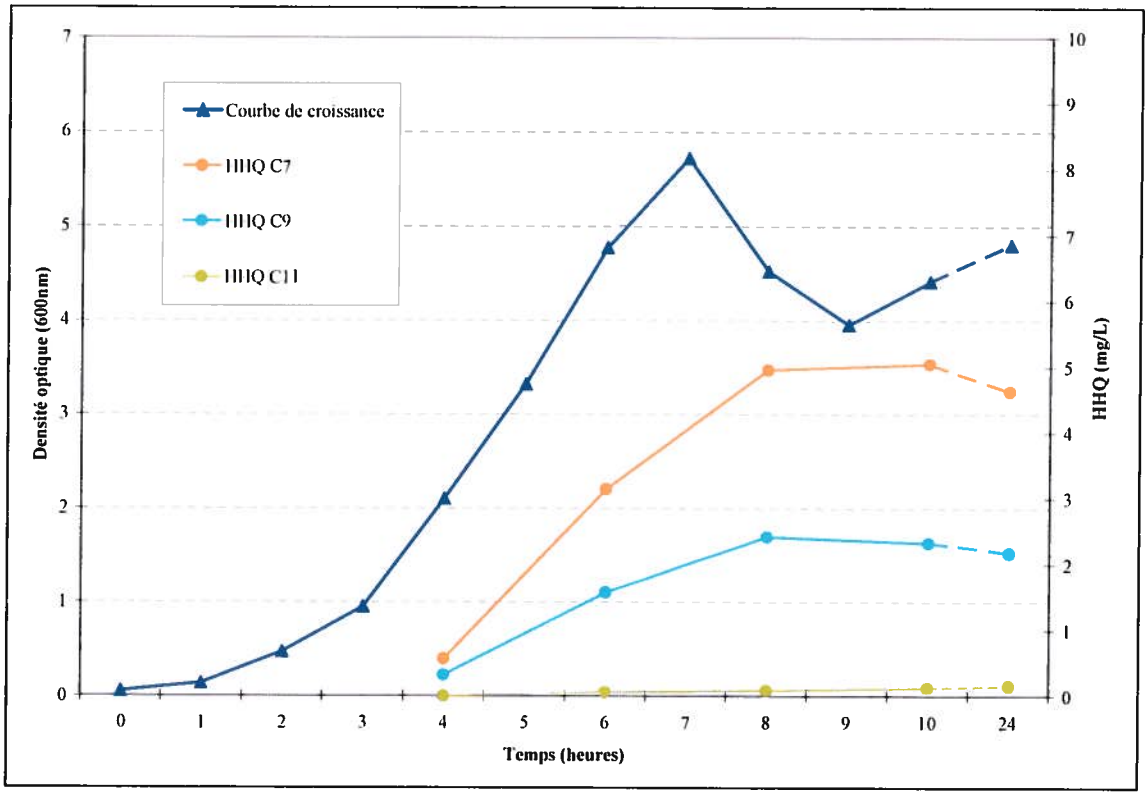


Figure 3.22 Courbe de croissance de *E. coli* pDN18 + pLG12 et sa production en HHQ C7, C9 et C11.

Du HHQ a été détecté dans la culture d'*E. coli* pDN18+pGL12. Le HHQC7, HHQC9 et le HHQC11 ont été détectés mais le dernier en très petites quantités (fig. 3.22). Le HHQ C7 est un peu moins abondant et beaucoup plus tardivement produit dans *E. coli* que dans PA14 (pics de production à 9 h. versus 5 h.). Afin d'observer une éventuelle augmentation de la production en HHQ suite à l'ajout des présumés ligands il faut sélectionner un moment dans la courbe de croissance où la production en HHQ n'est pas maximale, c'est-à-dire vers la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire.

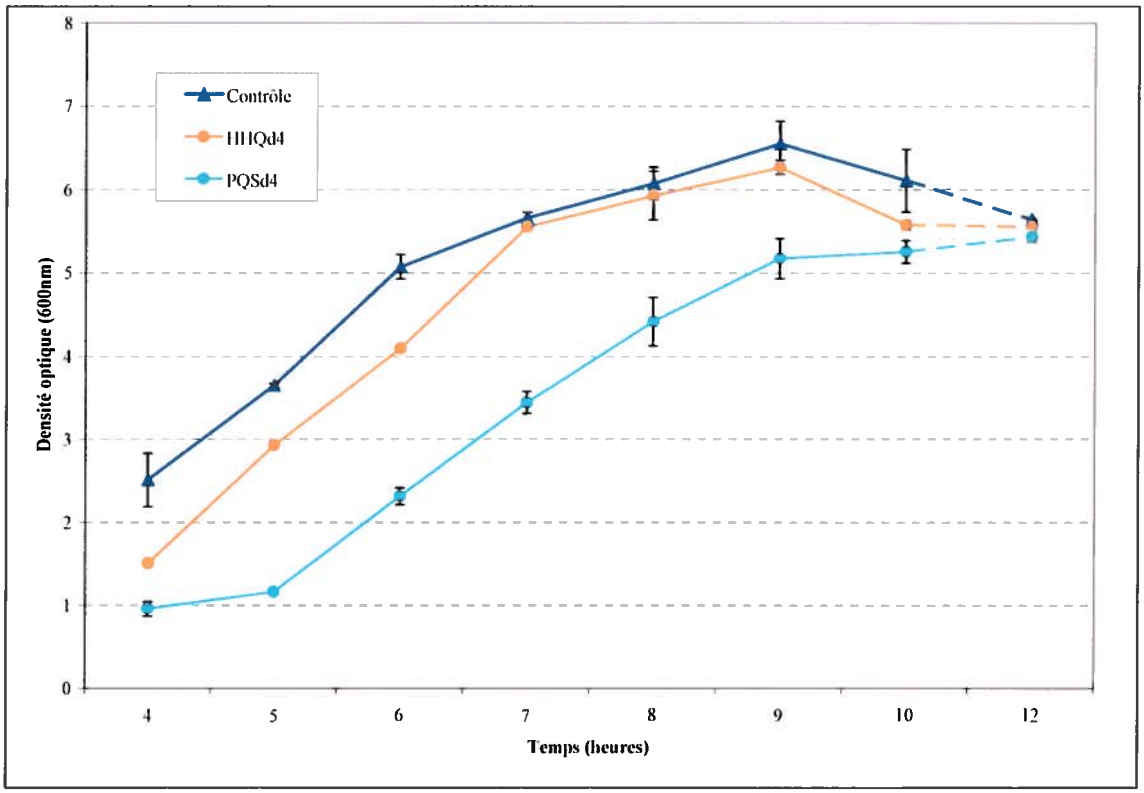


Figure 3.23 Courbes de croissance des cultures supplémentées au temps 0 en HHQd4 et en PQSd4 comparées au contrôle.

La courbe de croissance du contrôle de la figure 3.23 atteint une D.O. maximale de 6.5 comparativement à la figure 3.22 ou la D.O. n'est que de 5.7. De plus, le PQS semble avoir un effet retardateur sur la croissance d'*E. coli* tout comme chez *P. aeruginosa*. Les courbes de croissances sont assez différentes et le but est de les comparer à un moment similaire. Les points de comparaison des quantités produites en HHQ ont été choisis selon la D.O. qui varie entre 3.5 et 4 soit après 5 h. de culture pour le contrôle, 6h pour le HHQd4 et 7 h pour le PQSd4 (fig. 3.24). Toutes les courbes ont aussi été comparées au temps 12 h (fig. 3.25).

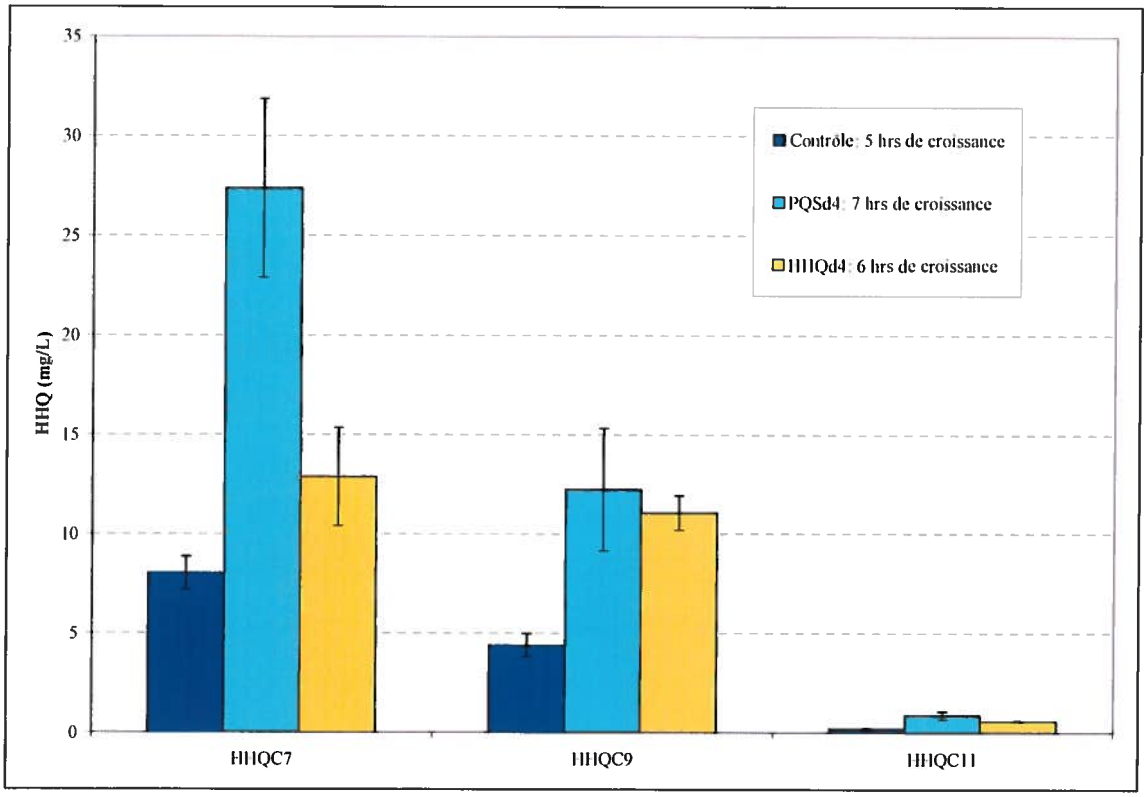


Figure 3.24 Production du HHQ chez *E. coli* pDN18+pLG12 suite à l'ajout de PQSd4 et de HHQd4 vers la fin de la phase exponentielle de croissance.

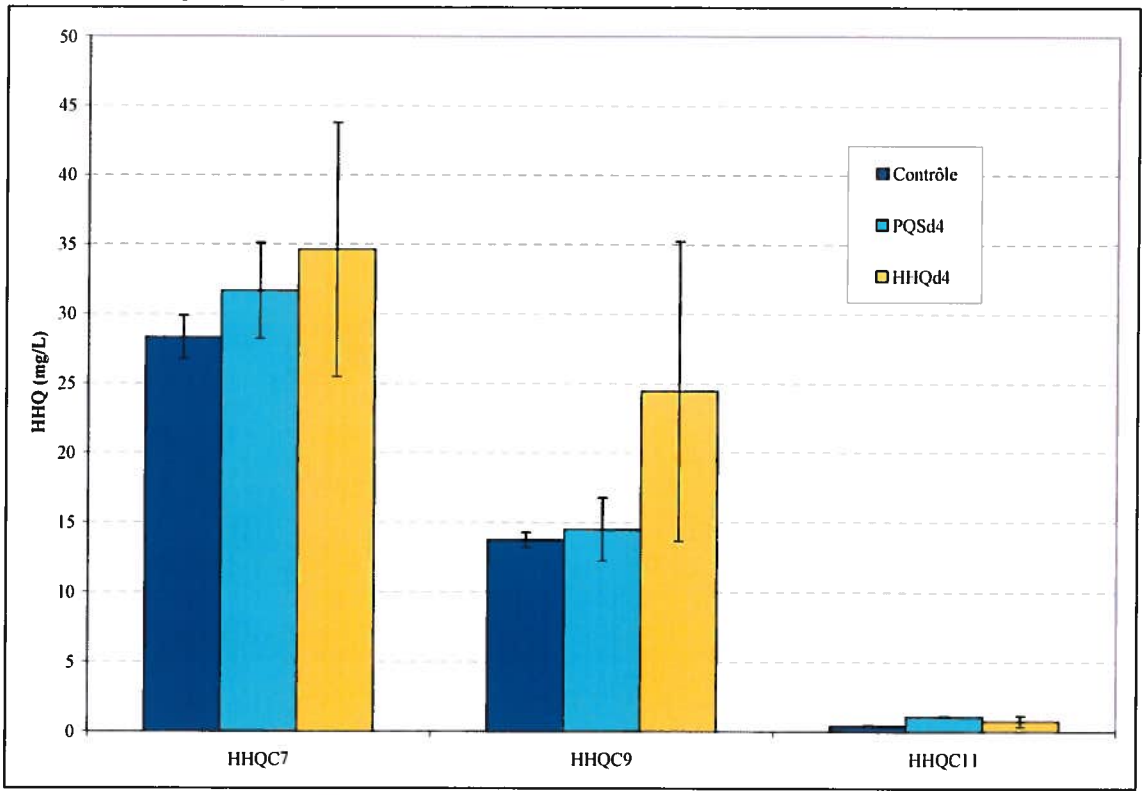


Figure 3.25 Production du HHQ chez *E. coli* pDN18+pLG12 suite à l'ajout de PQSd4 et de HHQd4 au début de la phase stationnaire après 12 heures de croissance.

Les ligands potentiels ajoutés étant deutérés on peut facilement évaluer la quantité de HHQ naturel produit par les cellules bactériennes sans interférence avec le composé rajouté, vu la différence de masse de quatre Daltons entre les deux produits. On remarque qu'à la fin de la phase exponentielle, l'ajout de PQSd4 semble augmenter la production de tous les HHQ mais particulièrement celui ayant une chaîne C7. En phase stationnaire, le HHQd4 favorise aussi la production de HHQ, mais l'écart d'avec le contrôle est plus grand avec le HHQ avec une chaîne C9. Cependant les écart-types sont considérables et cette différence ne semble pas significative

3.4 L'intermédiaire de biosynthèse des HAQ

Nous nous sommes également intéressé à tenter de détecter un intermédiaire putatif de la synthèse des HAQ, à savoir le produit d'addition entre l'acide anthranilique et le cétoacide, avant la réaction de cyclisation qui, après décarboxylation, génère les HAQ (fig. 3.26). Afin d'isoler l'intermédiaire putatif nous avons utilisé le mutants *pqsA*, délétion non polaire et *pqsC*. Ces deux mutants ne produisent pas de HAQ. Dans le mutant *pqsA*, l'enzyme responsable de l'activation du carbonyle n'est pas présente et il est possible que l'intermédiaire s'accumule et puisse être détecté. Les autres enzymes encodées par les gènes *pqsBCD* présentent des homologies de séquences avec des Acyl Carrier Proteins (ACP). Leurs fonctions ne sont pas définies, mais elles pourraient bien être impliquées dans la fixation et élongation de la chaîne alkyle du cétoacide et pourraient porter l'intermédiaire sous forme liée au niveau de la fonction acide du cétoacide. Il est donc possible qu'un mutant *pqsB*, *C* ou *D* puisse accumuler l'intermédiaire facilitant ainsi sa détection. Pour ce faire nous utiliserons l'acide anthranilique C14 et tenterons d'identifier un ou des composés radioactifs après séparation sur plaque chromatographique. Alternativement, nous tenterons d'observer une bande radioactive suite à une électrophorèse SDS-PAGE dans l'espoir d'observer une protéine rendue radioactive par la présence de l'acide anthranilique C14 de l'intermédiaire encore fixé à une ACP.

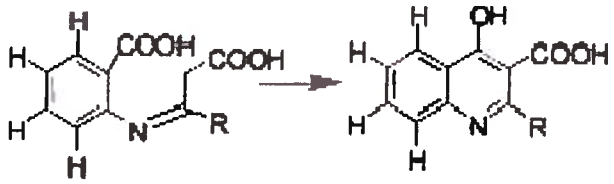


Figure 3.26 Intermédiaires hypothétiques de la biosynthèse des HAQ. Adaptée d'après Déziel *et al.* (2004).

3.4.1 Chromatographie sur couche mince

Des essais ont été effectués par chromatographie sur couche mince pour isoler l'intermédiaire. Les HAQ étant des molécules relativement non-polaires, il est justifié de croire que l'intermédiaire serait aussi relativement non-polaire. Des cultures totales des mutants *pqsA* et *pqsC* ont été extraites à l'acétate d'éthyle. Une fois l'extrait concentré, nous avons recherché une combinaison de solvants permettant de séparer les molécules sur deux dimensions.

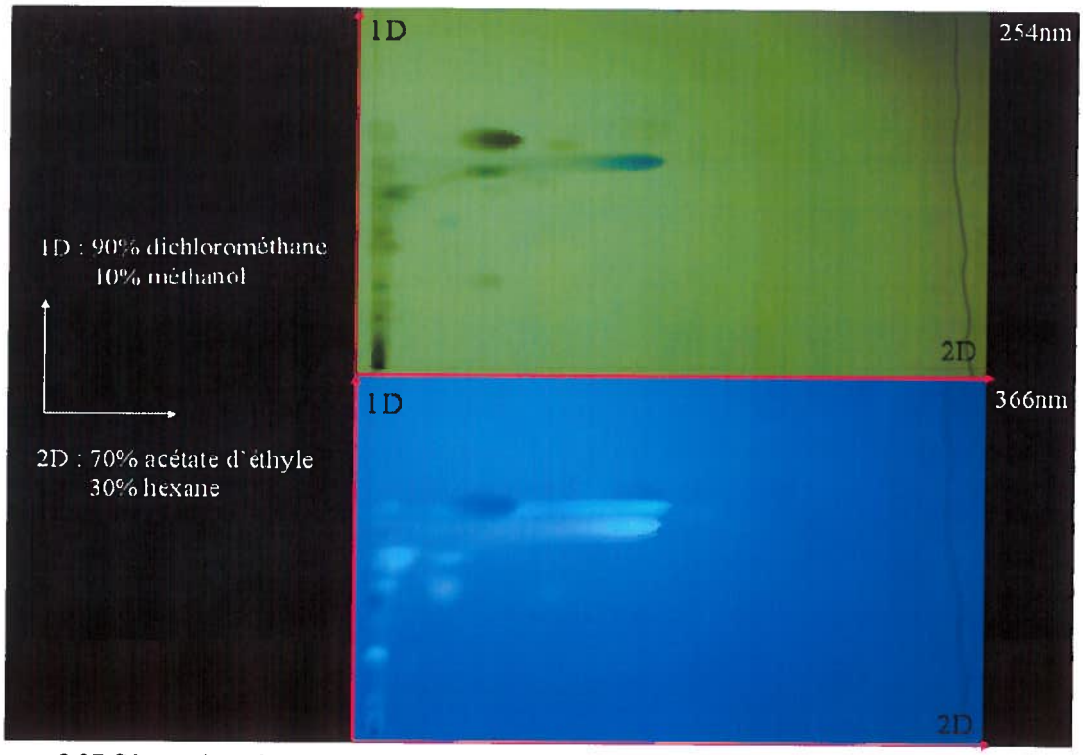


Figure 3.27 Séparation chromatographique sur couche mince vue à deux longueurs d'ondes, 254 et 366nm.

Pour la première dimension, un mélange de 90 % dichlorométhane et 10 % méthanol a été utilisé. En deuxième dimension, un mélange de 70 % acétate d'éthyle et 30 % d'hexane a permis de séparer une certaine quantité des composés (fig. 3.27). La plaque de silice contient du F254, un indicateur fluorescent excitable à une longueur d'onde de 254 nm. La plaque fluoresce partout à l'exception des endroits où se trouvent les composés organiques. À 366 nm, la plaque n'est plus fluorescente, mais certaines molécules émettent de la fluorescence à cette longueur d'onde, ce qui est le cas du PQS. De cette manière, des extractions à l'acétate d'éthyle des mutants *pqsA* et *pqsC* ont été analysées.

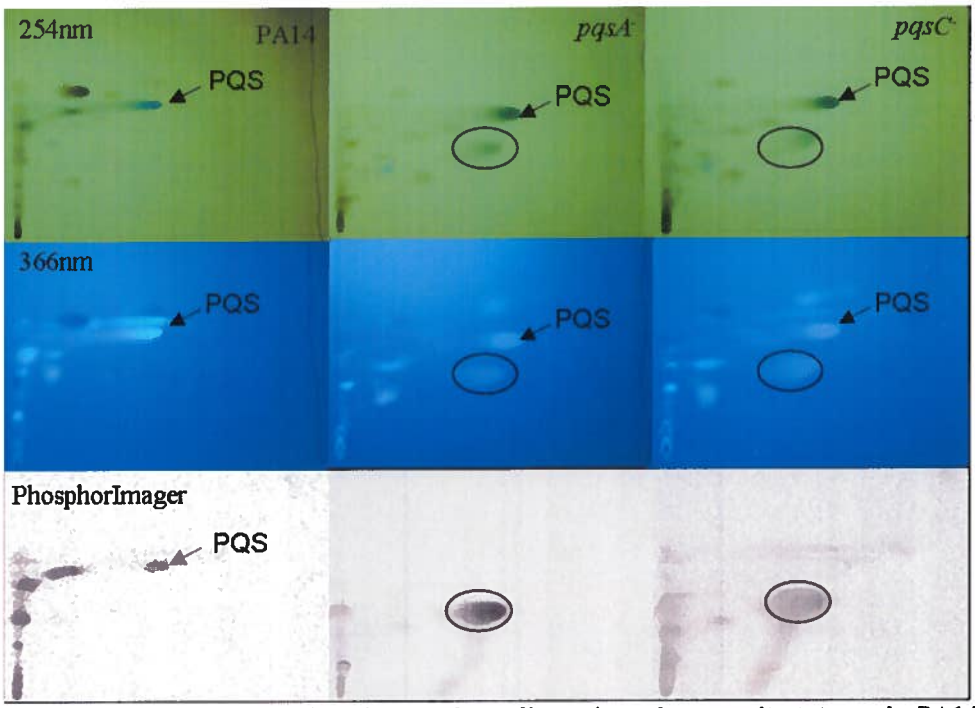


Figure 3.28 Comparaison de la migration en deux dimensions des extraits totaux de PA14 et des mutants *pqsA* et *pqsC* extraits à l'acétate d'éthyle.

Dix ppm de PQS ont été ajoutées aux cultures testées afin de permettre l'activation du régulateur MvfR (autrement inactif en absence de PQS) et l'expression des enzymes PqsA et PqsB dans le mutant *pqsC* . On observe donc du PQS endogène et exogène dans l'extrait de PA14, ainsi que du PQS exogène chez les mutants *pqsA* et *pqsC* (voir flèches fig. 3.28). L'ajout d'AA C14 au milieu de culture génère plusieurs composés radioactifs visibles au PhosphorImager. On remarque qu'une grande proportion de cette radioactivité n'est pas séparée en deuxième dimension. Un composé bien visible chez les mutants

pqsA et *pqsC* est encerclé dans la figure 3.28. Ce composé est radioactif et visible aux U.V. à 254 et 366 nm. Comme il n'est pas désirable de passer un échantillon radioactif en CL/SM, ce qui entraînerait une contamination de l'appareil, des cultures non-radioactives ont été extraites et séparées par chromatographie sur couche mince avec la même série de solvants et observées aux rayons UV.

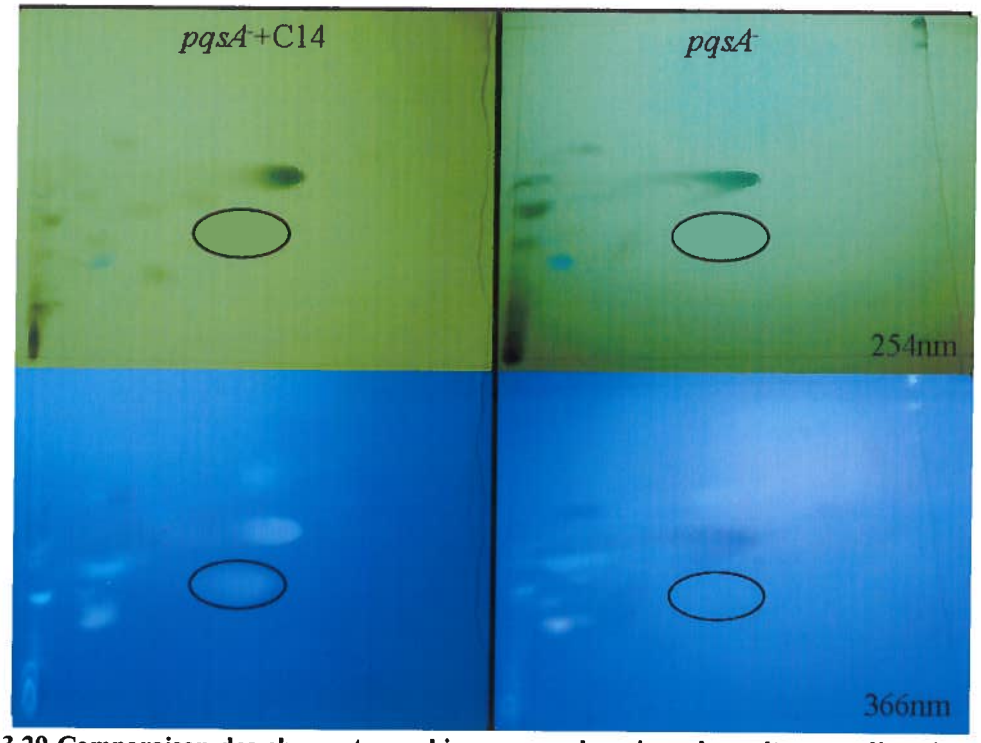


Figure 3.29 Comparaison des chromatographies sur couche mince des cultures radioactives et non-radioactives du mutant *pqsA*.

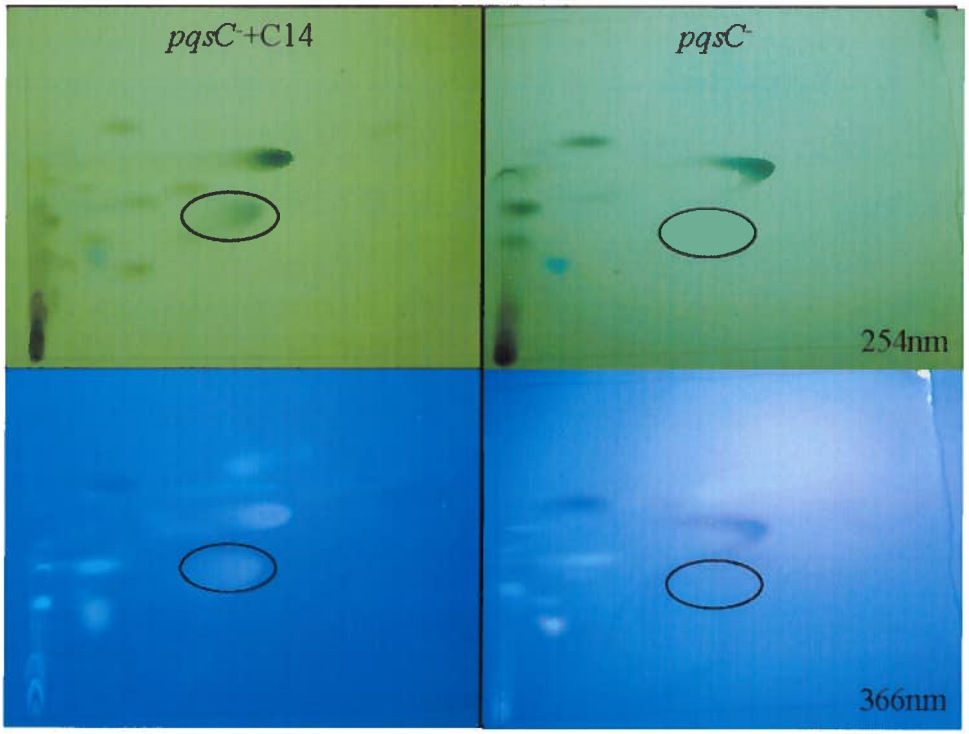


Figure 3.30 Comparaison des chromatographies sur couche mince des cultures radioactives et non-radioactives du mutant *pqsC*.

Les extraits non radioactifs montrent des profils différents des extraits radioactifs même sous UV et ce malgré le fait que les densités optiques des cultures étaient comparables soient de 3.52 et 3.64 pour *pqsA*⁻ et *pqsC*⁻ radioactifs, 3.71 et 3.57 pour *pqsA*⁻ et *pqsC*⁻ non-radioactifs. Le composé isolé sur les plaques radioactives n'est plus apparent sur les plaques non-radioactives, et ce, chez les deux mutants (fig. 3.29 et 3.30).

Les composés non séparés lors de la deuxième dimension ont été grattés des plaques radioactives et élués de la silice. Par la suite, une nouvelle combinaison de solvants plus polaires a été utilisée. Pour la première dimension un mélange de 95% dichlorométhane / 4% méthanol / 1% acide acétique a été utilisé. Pour la deuxième dimension, 25% acétate d'éthyle / 25% hexane / 25% méthanol / 25% dichlorométhane.

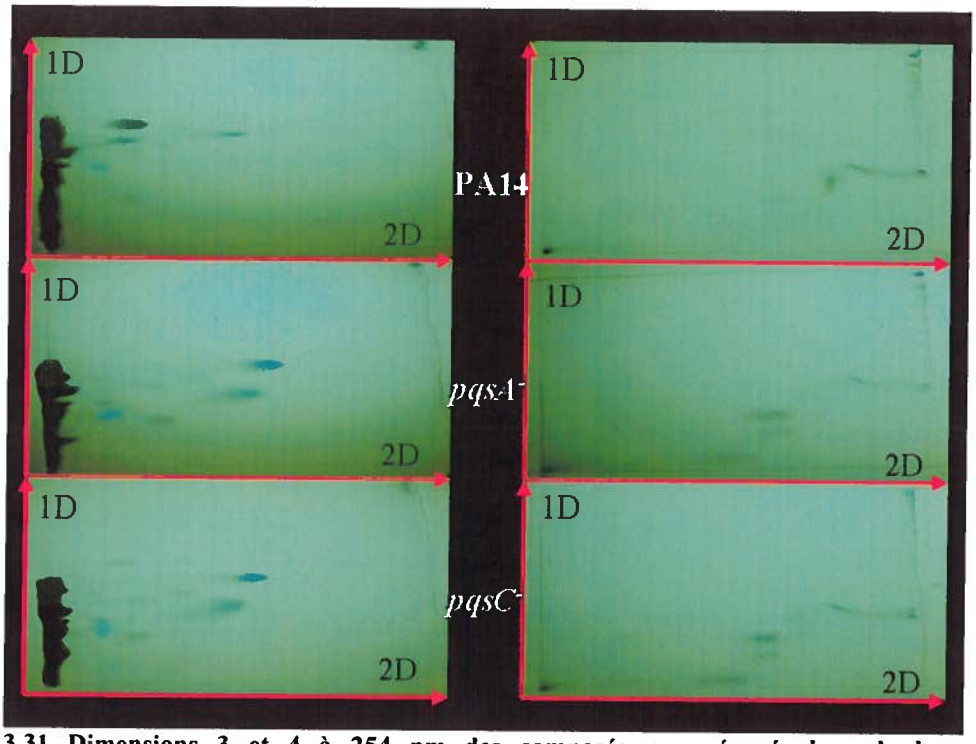


Figure 3.31 Dimensions 3 et 4 à 254 nm des composés non séparés lors de la première chromatographie sur couche mince.

À gauche de la figure 3.31 on peut voir les zones qui ont été grattées, éluées et séparées en 3^{ième} et 4^{ième} dimensions à droite. On observe une séparation de nombreux composés, trop polaires pour être séparés dans le premier système. Cependant il semble que la quantité de matériels séparés est très inférieure à ce qui a été prélevé de la plaque précédente. La figure 3.32 montre les plaques chromatographiques sous les U.V. à 254 et 366 nm ainsi que celles numérisées au PhosphorImager pour révéler la radioactivité.

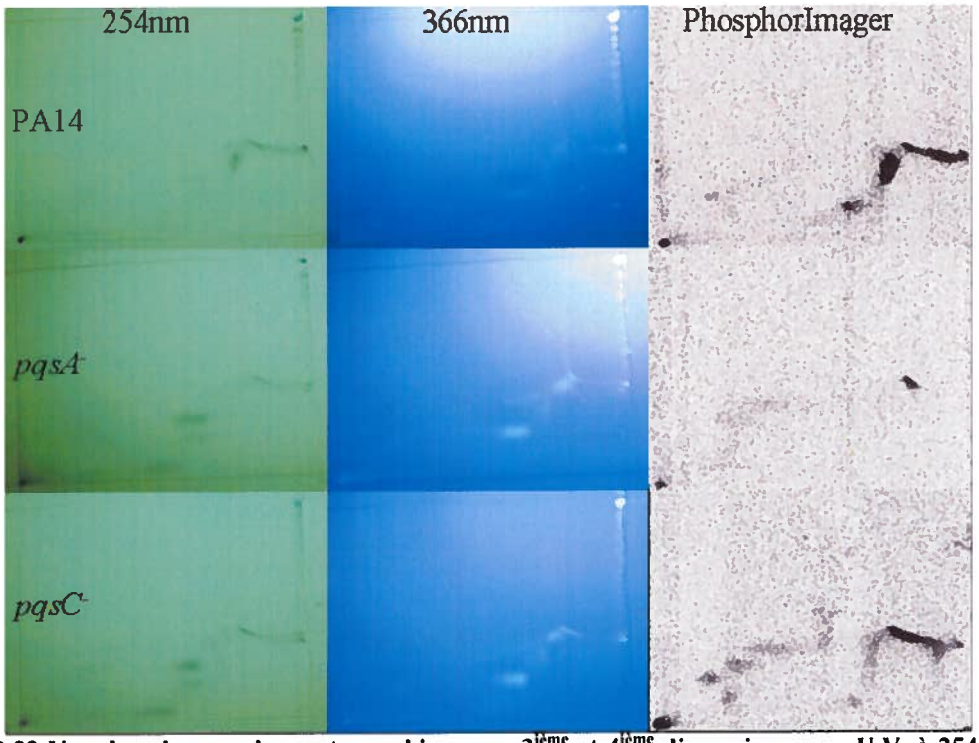


Figure 3.32 Vue des plaques chromatographiques en 3ième et 4ième dimensions sous U.V. à 254 et 366 nm ainsi qu'au PhosphorImager des extraits de la souche PA14 et des mutants *pqsA* et *pqsC*.

La concentration des composés apparaissant à 254 nm semble assez faible, les ombres laissées étant peu intenses. Cependant, en les comparant aux images prises au PhosphorImager, on remarque qu'il y a plusieurs composés radioactifs présents et laissant des empreintes très intenses. La qualité de la séparation est aussi moins bonne, avec de longues trainées qui semblent combiner différentes molécules. Finalement, aucun composé n'apparaît clairement chez au moins un mutant et étant absent chez PA14.

Afin de séparer les composés du milieu extracellulaire de ceux du milieu intracellulaire, la fraction cellulaire des cultures à été séparée du surnageant par centrifugation à la fin de l'incubation avec l'acide anthranilique C14 . Par la suite, les extractions à l'acétate d'éthyle ont eu lieu séparément pour chacune des fractions. Les figures 3.33 à 3.35 représentent les extraits des fractions cellulaires ainsi que le surnageant séparé par chromatographie sur couche mince. Les conditions de migrations utilisées sont les mêmes que lors de la première série, c'est-à-dire un mélange de 90 % dichlorométhane et 10 % méthanol pour la 1ière dimension et pour la 2ième dimension, un mélange de 70 % acétate d'éthyle et 30 % d'hexane.

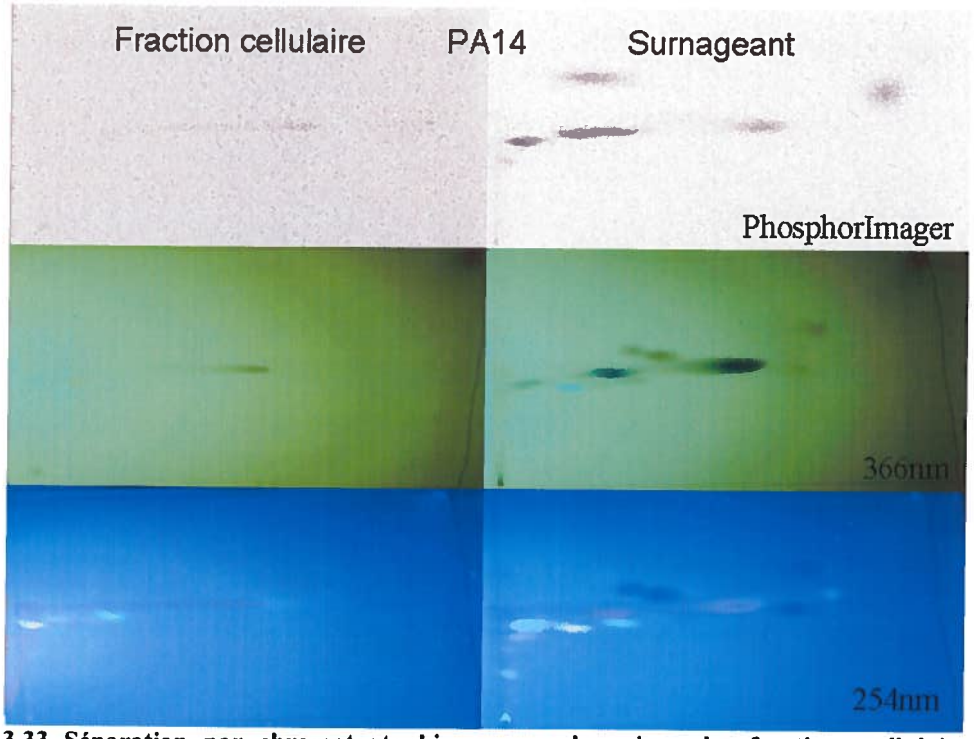


Figure 3.33 Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant de la souche PA14 vue au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm.

On remarque qu'il y a présence de PQS dans la fraction cellulaire de la souche PA14. Cependant il semble y en avoir en quantités beaucoup moins importantes comparativement au surnageant. De plus, la fraction cellulaire contient beaucoup moins de composés que le surnageant. La séparation des fractions permet de visionner des plaques beaucoup moins chargées en matériel.

Les mutants *pqsA* (fig. 3.34) et *pqsC* (fig. 3.35) possèdent très peu de matériel dans les fractions cellulaires. D'ailleurs, rien n'est visible aux U.V. et seulement une très petite quantité de radioactivité est détectable chez le mutant *pqsA*. On retrouve dans le surnageant des deux mutants le composé vu lors de la première série d'essais, mais avec moins d'intensité. Les D.O. des cultures de *pqsA*⁻ et *pqsC*⁻ sont de 3.76 et 3.49 respectivement. On voit aussi le PQS qui a été ajouté aux cultures, ombre qui se trouve au-dessus du composé recherché.

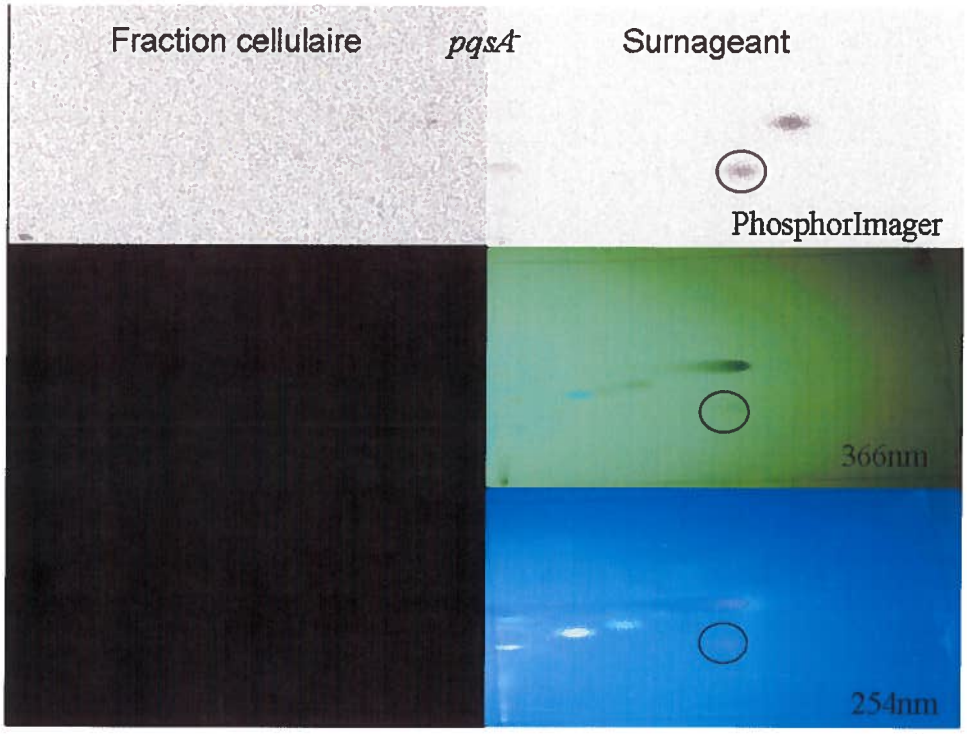


Figure 3.34 Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant du mutant *pqsA* vue au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm.

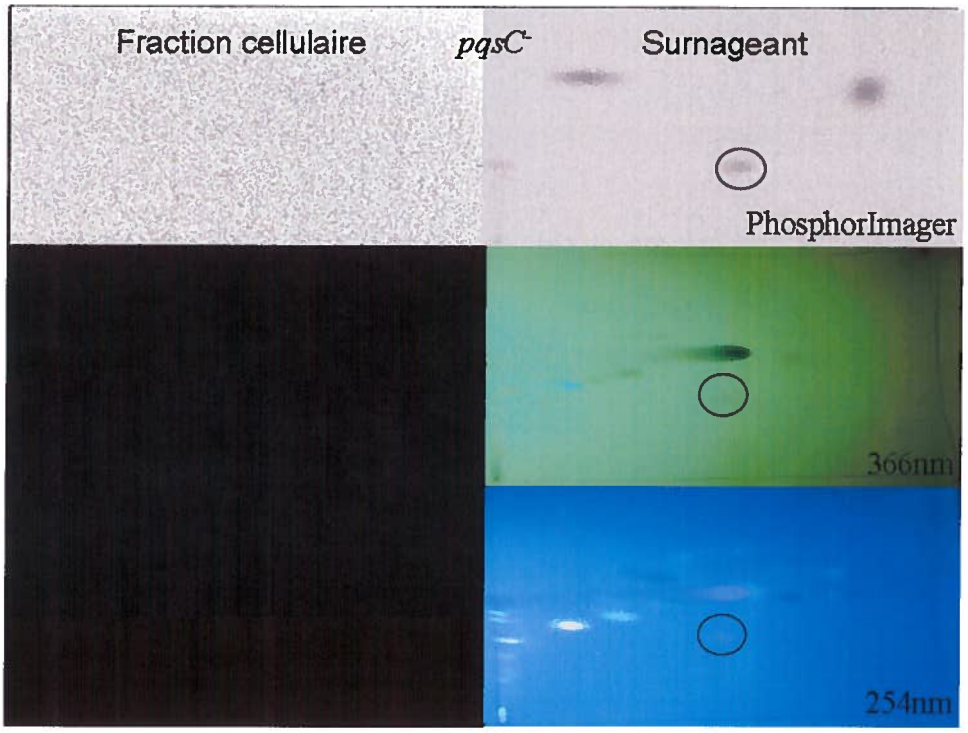


Figure 3.35 Séparation par chromatogtaphie sur couche mince des fractions cellulaires et du surnageant du mutant *pqsC* vue au PhosphorImager et aux U.V. à 254 et 366 nm.

Les ombres encerclées ont été retrouvées sur les plaques non-radioactives. Elles ont été extraites et éluées pour ensuite être analysées en spectrométrie de masse par injection directe. Cependant, en comparant avec un contrôle correspondant a une région de la plaque de silice ne contenant aucun produit visible en UV, le spectre SM ne montre aucun ion se démarquant en intensité. Il a donc été établi qu'une extraction devait être effectuée à partir d'un plus grand volume de culture, 500 mL comparativement à 50 mL pour les essais précédents, afin de concentrer au maximum ce composé inconnu chez les mutant *pqsA* et *pqsC* (fig. 3.36).

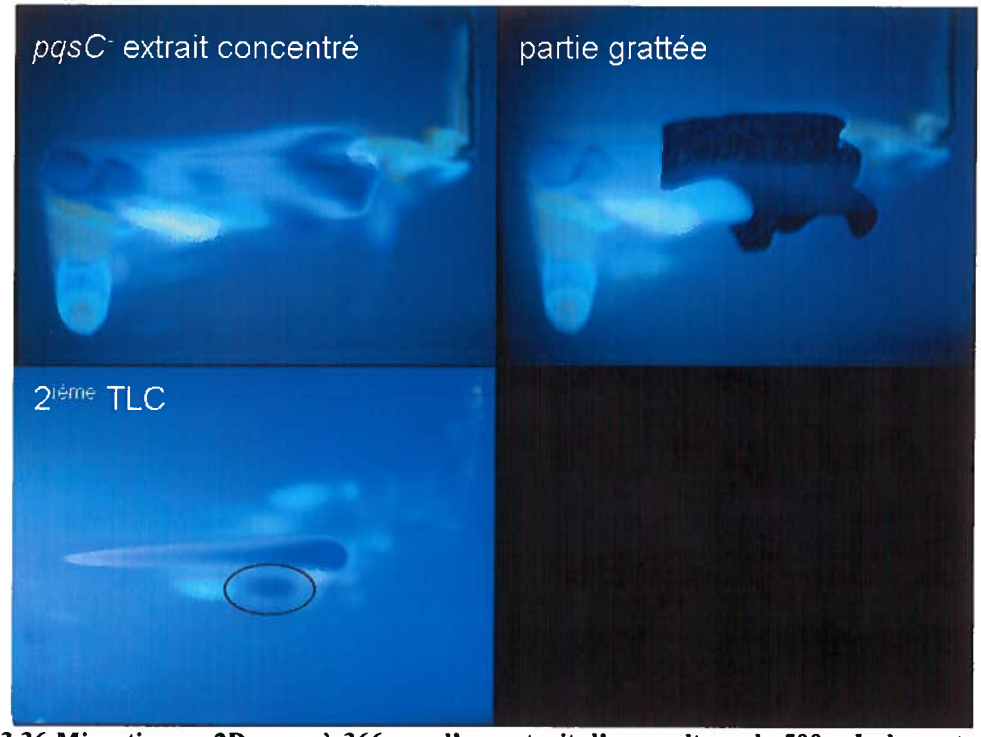


Figure 3.36 Migration en 2D vue à 366 nm d'un extrait d'une culture de 500 mL du mutant *pqsC* (A). La partie extraite de la plaque (B). Migration dans les mêmes conditions de la partie éluée de la 1ière chromatographie (c).

La quantité de matériel déposé sur la plaque est très importante. La migration en 2D de l'extrait est floue. La section des plaques soupçonnée de contenir le composé a été extrait et réappliqué sur une deuxième plaque dans les mêmes conditions pour éliminer du matériel. On remarque que la seconde plaque de chromatographie est beaucoup plus nette dans la définition des composés. On retrouve une tache aux mêmes coordonnées que dans les essais précédents. Ce composé a été gratté, élué de la silice et analysé en

spectrométrie de masse en injection directe. Encore une fois, malgré la forte intensité du composé observé en chromatographie sur couche mince, il n'a pas été possible d'identifier cette molécule. La comparaison avec un contrôle n'a pas permis d'identifier un ion majoritaire chez les mutants *pqsA* et *pqsC*. Une même série de tests à été effectués avec le mutant *pqsD,* et ce sans résultat concluant.

3.4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Dans l'optique de rechercher une protéine de type ACP liée à l'intermédiaire et visualisée grâce à l'acide anthranilique C14, il nous a fallu trouver des conditions les moins dénaturantes possible pour ne pas couper le lien thioester relativement fragile entre la protéine et la fonction acide du cétoester. Des gels en conditions non-dénaturantes, c'est-à-dire, en absence de SDS, de mercaptoéthanol et de chaleur, ont été testés. La migration des extraits se faisait très lentement et laissait des accumulations de protéines au niveau des puits. Pour ne pas trop dénaturer les échantillons, nous avons utilisé le SDS dans les gels de concentration et de séparation ainsi que dans le tampon Tris-Glycine à 0.1%. Le tampon de chargement ne contenait aucun agent dénaturant.

La figure 3.37 montre un gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes. Le but en séparant les fractions membranaires, cytoplasmiques et le surnageant est de pouvoir identifier la fraction radioactive. On remarque qu'il y a davantage de contenu protéique dans la fraction cytoplasmique et très peu dans la fraction membranaire et le surnageant. La séparation des protéines n'est pas nette, il est difficile de distinguer chacune des bandes. Ce même gel a été exposé à la plaque de PhosphorImager afin de révéler la position des protéines marquées radioactivement. Cependant, aucune radioactivité n'a été révélée, ni chez les mutants, ni dans la souche sauvage.

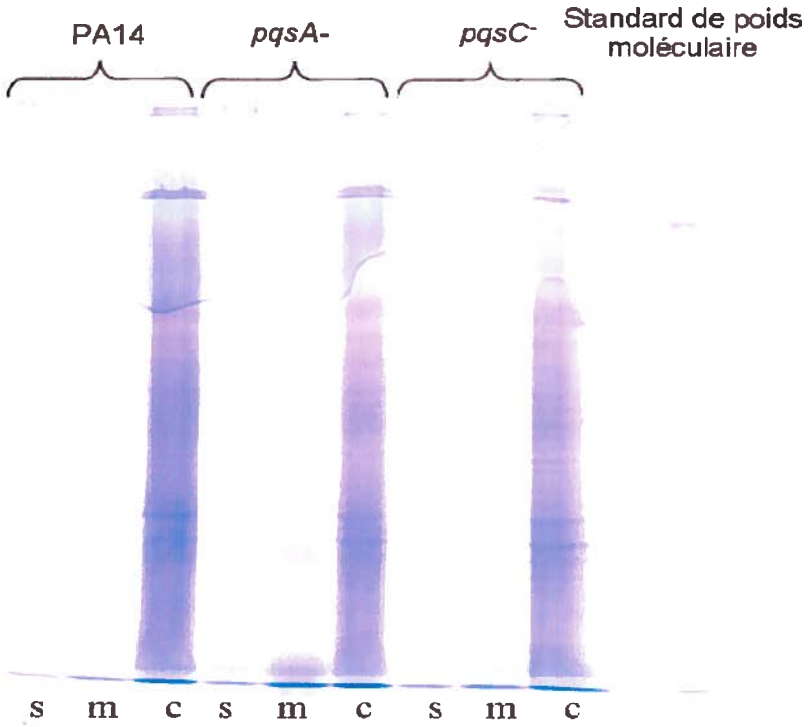


Figure 3.37 Gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes du surnageant et des fractions membranaires et cytoplasmiques des mutants *pqsA*, *pqsC* et de la souche sauvage PA14. s : surnageant; m : membranes; c : cytoplasme.

Les fractions cellulaires, membranaires et le surnageant des mutants *pqsA* + pLG12 (*pqsABCD*) et *pqsA* + pLG14 (*pqsABC*) cultivés en présence d'acide anthranilique C14 ont été séparés sur gel. Ces plasmides multi-copies permettent une surproduction des gènes *pqsABC* et *pqsABCD*. Cette surproduction pourrait se traduire en une augmentation de la production des enzymes et donc une meilleure identification de celles-ci sur gel au PhosphorImager.

Comparativement à la figure 3.37, on voit apparaître davantage de protéines dans les fractions membranaires et dans le surnageant des mutants *pqsA* (pLG12) et *pqsA* (pLG14) (fig. 3.38). On observe certaines bandes majoritaires présentes dans les trois fractions cytoplasmiques des mutants et de PA14. On peut faire la même observation par rapport aux fractions membranaires. Aucune bande protéique n'est présente majoritairement chez *pqsA* (pLG14) et absente ou en faible concentration chez *pqsA* (pLG12) et chez PA14. Le gel a été numérisé au PhosphorImager pour détecter la radioactivité.

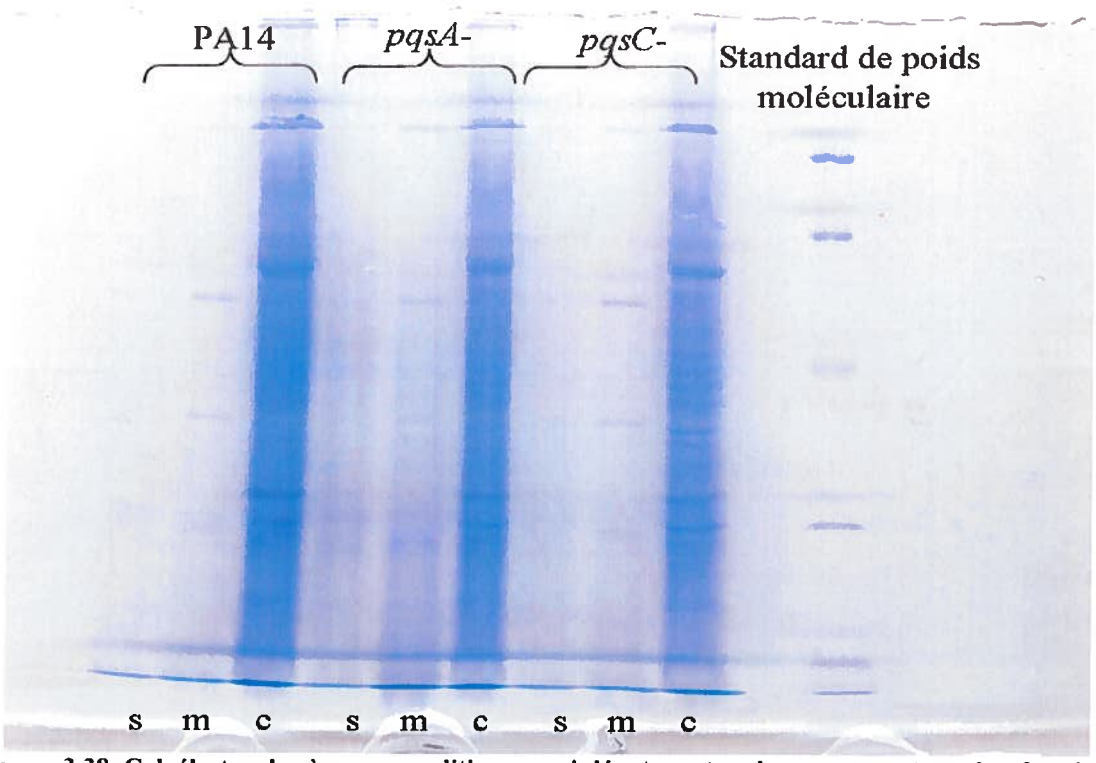


Figure 3.38 Gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes du surnageant et des fractions membranaires et cytoplasmiques des mutants *pqsA* (pLG12), *pqsA* (pLG14) et de la souche sauvage PA14. s : surnageant; m : membranes; c : cytoplasme.

Aucune protéine radioactive n'a été détectée sur gel. Un papier filtre sur lequel des marqueurs ont été déposés ainsi que les échantillons préparés pour le gel d'électrophorèse a été numérisé au PhosphorImager. On y voit bien les taches laissées par les échantillons radioactifs des extraits membranaires, cytoplasmiques et du surnageant

Lors de la recherche d'un intermédiaire de biosynthèse des HAQ, la chromatographie sur couche mince et l'électrophorèse sur gel ont été utilisées. La chromatographie a permis d'isoler un composé d'intérêt mais qui n'a pu être identifié par spectrométrie de masse. L'électrophorèse sur gel n'a pas permis d'identifier une fraction radioactive dans laquelle rechercher une enzyme participant à la biosynthèse des HAQ.

Chapitre IV

Discussion

Le quorum sensing joue un important rôle dans la régulation globale des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* lors de différents genres d'infections. Tout comme l'utilisation de plusieurs antibiotiques servant à l'inhibition d'infections bactériennes, il existe une crainte concernant l'émergence de mutants résistants lors de traitements antibiotiques. L'inhibition du quorum sensing n'est pas à l'abri d'une telle possibilité. Il a déjà été démontré qu'un mutant *las* chez *P. aeruginosa* et cultivé par pression sélective ait donné naissance à des mutants spontanés capables de produire certains facteurs de virulence contrôlés par *las*. Cependant, aucun mutant du genre n'a été trouvé lorsque les gènes *las* et *rhl* étaient supprimés (Van Delden et Iglewski, 1998). Ces résultats montrent l'importance de cibler non pas un seul mais bien les deux systèmes de QS afin d'inhiber la production des facteurs de virulence. Cette nouvelle approche dans la lutte contre les bactéries pathogènes touche la virulence des bactéries plutôt que la viabilité cellulaire, laissant aux défenses de l'hôte le soin d'éliminer l'infection d'un microorganisme moins virulent. Le QS peut être inhibé de différentes manières et probablement que ces différentes approches seront nécessaires afin d'obtenir une inhibition complète de la virulence. De plus, en y intégrant les antibiotiques classiques utilisés contre *P. aeruginosa*, les inhibiteurs du QS pourraient conduire à la disparition des infections à *P. aeruginosa* (Van Delden et Iglewski, 1998). Ce système représente donc une nouvelle avenue dans le développement de nouveaux composés utilisables dans le traitement d'infections bactériennes.

Dans cette étude, nous avons travaillé sur un des systèmes contrôlant le quorum sensing chez *P. aeruginosa.* Dans ce système, le régulateur transcriptionnel MvfR contrôle la production des HAQ, qui incluent des molécules signal comme le HHQ et PQS, et l'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence. Appartenant à la famille des régulateurs LysR, il a été démontré (Xiao et al, 2006) que l'activité de MvfR est régulée par les composés qu'il contrôle, possiblement certains HAQ. Des études précédentes ont démontré que l'acide anthranilique est le précurseur de tous les HAQ (Bredenbruch *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2004). À partir de ces observations, la possibilité a été émise qu'un analogue de l'acide anthranilique puisse compétitionner avec le précurseur pour

prévenir la formation de HAQ, ce qui pourrait permettre d'inhiber l'expression de gènes de virulence dépendants de MvfR.

4.1 La sélection des inhibiteurs

L'objectif de cette approche est d'inhiber la synthèse de HAQ en inhibant PqsA, l'enzyme responsable de la première étape de la biosynthèse des HAQ. Pour ce faire, nous utiliserons des analogues structurels du précurseur naturel, pour inhiber de façon compétitive le site actif de l'enzyme (quelle est l'évidence qu'un analogue se fixe au site actif?). Les paramètres étudiés ont été l'inhibition de la synthèse des HAQ, l'effet sur la croissance bactérienne causant ainsi une répercussion indirecte sur la production des HAQ et finalement, la dégradation des inhibiteurs. Afin d'être utilisable dans un éventuel traitement, le composé choisit se doit en effet d'être efficace à la plus petite dose possible, mais il doit également être relativement stable lors du traitement, entre autre vis-à-vis la bactérie. De plus si nous visons spécifiquement un effet sur la virulence, nous voulons éviter un effet inhibiteur sur la croissance, ce qui fausserait l'interprétation des résultats et pourrait conduire à l'apparition de résistance, ce que nous voulons éviter. Les différents inhibiteurs potentiels testés sont des analogues structurels de l'acide anthranilique. Basé sur des analogies de structure avec d'autres enzymes ayant une fonction d'activation de la fonction carbonyle de composés aromatiques comme le 2- ou le 4-hydroxbenzoate, il semble que PqsA aurait comme fonction d'activer le groupement carbonyle de l'acide anthranilique à l'aide d'un groupe CoA. Des analogues structurels de l'acide anthranilique pourraient donc compétitionner avec le site actif de l'enzyme et arriver à bloquer l'activation du groupement acyle de l'acide anthranilique, inhibant du même coup la synthèse des HAQ. L'anthranilate de méthyle a déjà été testé par Calfee *et al.* (2001) chez *P. aeruginosa* souche PAO1. À une concentration de 1.5 mM, cette molécule réduisait la production de PQS de 60% et démontrait une réduction de la production de l'élastase, un facteur de virulence.

La moyenne des contrôles testés lors de la sélection des inhibiteurs (fig. 3.1) montre qu'il y a une variation notable lors des expérimentations exécutées à différents jours. Ceci peut

être dû à des variations des conditions de croissances telles le milieu de culture, la température d'incubation ainsi que l'agitation des Erlenmeyers. Il est difficile de contrôler parfaitement ces deux derniers paramètres puisque l'utilisation en commun de l'agitateur peut causer des arrêts, même brefs, de l'agitation et provoquer de petites variations de température pouvant engendrer ces variations. En ce qui concerne la production des HAQ, nous remarquons qu'il y a accumulation de HHQ au tout début de la croissance bactérienne. PqsH, l'enzyme nécessaire à la transformation du HHQ en PQS semble s'activer lors des 5 premières heures d'incubation, probablement suite à l'accumulation du précurseur pour produire du PQS. Le PQS quant à lui, voit sa concentration augmenter graduellement à partir de 5 h. jusqu'au temps 25 h pour atteindre sa concentration maximale. Celle-ci diminue après 25 h. Le PQS semble être un produit final de la biosynthèse des HAQ (Lépine *et al.*, 2003) et la diminution de sa concentration peut donc laisser croire que ce composé est dégradé. Ceci pourrait être nécessaire afin de réguler la cascade d'activation des gènes de virulence lorsque ceux-ci ne sont plus requis. Le N-oxide est produit tout au long de la croissance. Ce composé est reconnu pour ses propriétés antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Déziel *et al.*, 2004; Machan *et al.*, 1992). L'accumulation dans le milieu de culture du N-oxide pourrait ainsi protéger la culture bactérienne vieillissante contre des compétiteurs potentiels pour l'espace ou les nutriments.

En général, on remarque que les analogues de l'acide anthranilique arrivent à diminuer la production en HAQ. Deux molécules semblent augmenter légèrement la production de certains HAQ, soit l'alcool 2-aminobenzylique (fig. 3.5) et l'acide 2-nitrobenzoïque (fig. 3.11). La consommation du HHQ entre les temps 5 et 25 h. semble se faire plus lentement en présence de ces deux composés. Dans le cas de l'acide 2-nitrobenzoïque (fig. 3.11) on note un léger ralentissement de la production de PQS par rapport au contrôle qui pourrait expliquer la plus lente disparition de son précurseur le HHQ.

Le 2-aminoacétophénone est une molécule produite naturellement par *P. aeruginosa* (Cox et Parker, 1979). Analogue structurel de l'acide anthranilique et dépendant de PqsA pour sa production, le 2-aminoacétophénone pourrait bien être un inhibiteur naturel de la

production des HAQ. Les tests démontrent que cette molécule arrive à diminuer la production du HHQ dans une proportion de 33%. La production du PQS, tout comme celle du N-oxide diminue dans une proportion de 42 et 41% respectivement. Cette molécule, même si elle ne démontre pas une capacité d'inhibition aussi importante que certains des autres analogues testés, pourrait peut-être servir de régulateur de la production des HAQ et du système du quorum sensing vers la fin de la période de croissance.

L'anthranilate de méthyle semble réagir différemment en présence de la souche PA14 comparativement à la souche PAO1 testée par Calfee. Nous avons utilisé la même concentration de cet inhibiteur (1.5 mM) que dans l'article de Calfee, mais, contrairement à ces derniers, nous avons observé un effet inhibiteur non négligeable sur la croissance de PA14 comparativement à PAO1. Il faut cependant remarquer que les milieux de cultures utilisés étaient différents. Nous avons utilisé le milieu Luria Bertani comparativement au « peptone trypticase soy broth » de Calfee. De plus, les températures d'incubation sont différentes, soit 34°C dans notre étude comparativement à 37°C mentionné dans l'article. Donc, bien que PA14 puisse réagir différemment face à l'anthranilate de méthyle, il se pourrait que les conditions de culture ainsi que le milieu puissent influencer l'interaction entre le MA et la cellule bactérienne. Nous avons suivi la dégradation des inhibiteurs dans le milieu de culture et nous en avons retrouvé 100% après 35 h. de culture. L'article de Calfee *et al.* ne montrait pas la quantification du composé suite à l'incubation.

Nous avons évalué la dégradation de tous les inhibiteurs testés dans le milieu de culture après incubation. Cet aspect dans l'évaluation de molécules potentielles comme agent inhibiteur est important. La dégradation d'un médicament peut conduire à une diminution de l'efficacité thérapeutique et, parfois, à la formation de produits à l'origine d'effets indésirables ou toxiques (Dawson *et al.*, 1994) rendant impossible l'utilisation d'un tel produit comme agent thérapeutique chez l'humain. La découverte d'un composé ayant l'activité recherchée ne constitue donc que le début d'un processus. Le composé devra passer

une série de test afin de déterminer son comportement dans une série de conditions entraînant sa dégradation.

À l'aide des différents paramètres évalués, l'inhibition des HAQ, la croissance bactérienne et la dégradation des molécules dans le milieu de culture, nous avons identifié 3 analogues de l'acide anthranilique ayant des propriétés intéressantes en tant qu'inhibiteurs de la biosynthèse des HAQ. Il s'agit de l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, de l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque et de l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque. Par chromatographie liquide couplée au spectromètre de mase, nous avons trouvé que ces trois molécules inhibent dans une proportion intéressante les HAQ et ce sans affecter trop la croissance bactérienne. Ultimement, un suivi plus complet de la dégradation du 4Cl et du 6F serait à effectuer, considérant leur faible pourcentage résiduel dans le milieu.

Deux voies sont impliquées dans la synthèse des HAQ à partir du précurseur, l'acide anthranilique. L'une permet la production de N-oxide, une famille de composés antibactériens et d'inhibiteurs du cytochrome. La seconde voie mène à la production de HHQ suivi de la conversion en PQS, des molécules de communication (Déziel *et al.*, 2004). Malgré l'analogie de structure entre le N-oxide et le HHQ, ce dernier ne semble pas être le précurseur du premier (Déziel *et al.*, 2004). Le fait que le 4Cl, le 6Cl ainsi que le 6F, soient capables d'inhiber la synthèse du HHQ, du PQS ainsi que du N-oxide, suggère que ces analogues de l'AA inhibent une enzyme commune aux deux voies de biosynthèse avant leur séparation. La biosynthèse des HAQ s'effectue par l'addition de l'acide anthranilique à un cétoacide (Ritter et Luckner, 1971; Déziel *et al.*, 2004; Bredenbruch *et al.*, 2005). Un analogue de l'AA pourrait aussi agir en inhibant cet appariement.

L'acide anthranilique est impliqué dans plus d'une voie de synthèse chez les bactéries. Chez *P. aeruginosa* l'AA est produit par plusieurs anthranilate synthases (TrpEG et PhnAB) et est notamment utilisée comme précurseur dans la biosynthèse du tryptophane (Essar *et al.*, 1990b). Des travaux effectués chez *E. coli* ont déjà montré que des

analogues de l'AA peuvent inhiber l'activité de l'anthranilate synthase (Held et Smith, 1970; Moyed, 1960). Ces travaux suggèrent donc que des molécules analogues à l'acide anthranilique comme le 4Cl, le 6Cl et le 6F puissent également intervenir au niveau de la synthèse de l'acide anthranilique, le précurseur des HAQ.

4.2 Le mode d'action des inhibiteurs

Un inhibiteur compétitif est une molécule qui inhibe l'activité d'une enzyme car elle entre en compétition avec le substrat pour le site actif de celle-ci (Prescott, Harley et Klein, 1995). Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat. La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformable par l'enzyme, soit parce que la position du groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa transformation par le site actif (Koolman et Röhm, 1999). Un inhibiteur non compétitif sera, quant à lui, une molécule qui va inhiber l'activité enzymatique en se liant à un site distinct du site actif (Prescott, Harley et Klein, 1995).

Un premier test a été effectué afin de vérifier si les inhibiteurs peuvent agir au niveau de la synthèse de l'AA. L'accumulation transitoire de l'acide anthranilique dans les extraits de PA14 mis en culture avec le 4Cl, le 6Cl ou le 6F est semblable à l'accumulation observée chez le mutant *pqsA*. Ce mutant ne peut produire de HAQ, ce qui est le cas de la souche PA14 lorsqu'elle se trouve en présence d'un des trois inhibiteurs. Cette accumulation s'explique par le fait que l'AA est le précurseur commun des HAQ. Lorsqu'il n'y a pas de HAQ produits, cet AA s'accumule mais de manière transitoire. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'AA accumulé peut être réutilisé au niveau de la synthèse du tryptophane. Le contrôle PA14 qui produit des HAQ utilise l'AA, ce qui explique donc l'absence d'accumulation.

Un second test de compétition avec l'acide anthranilique a été effectué dans le but de clarifier le mode d'action des inhibiteurs, plus spécifiquement afin de vérifier s'ils agissent sur une enzyme de l'opéron *pqsABCD* ou si leur effet se fait sentir sur un autre

système enzymatique de la bactérie et n'affecte qu'indirectement la production des HAQ. Des analogies de structures entre PqsA et des enzymes impliquées dans l'activation de la fonction acyle d'acide organique aromatique (comme en possède l'acide anthranilique), montrent qu'il est vraisemblable que PqsA soit l'enzyme affectée par une telle inhibition. Dans le cas de l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque et de l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque (figure 3.20), plus il y a d'AA ajouté au milieu de culture, plus il y a de HAQ produits, ce qui indique selon les résultats précédents qu'ils compétitionnent pour le site actif de l'enzyme PqsA. Pour ce qui est de l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, on ne remarque pas d'effet de compétition comparativement aux deux autres inhibiteurs. Ceci semble prouver que cette molécule agit différemment lors de l'inhibition des HAQ. Quant au témoin, l'addition d'AA ne permet pas d'augmenter la production des HAQ. Il est reconnu que le QS est influencé par plusieurs événements dont des facteurs nutritionnels. Il se pourrait que l'acide anthranilique puisse devenir une source de carbone lorsque présent en quantité importante dans le milieu de culture. Ceci pourrait alors affecter le système du QS et ainsi provoquer une diminution de la production en HAQ lorsque l'on augmente la concentration en AA.

Une inhibition irréversible est créée par la formation d'un complexe stable avec l'enzyme visant à l'inactiver de façon permanente. L'enzyme reconnait l'inhibiteur comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. Intervient alors une étape au cours de laquelle l'inhibiteur se lie de façon très stable à l'enzyme (Koolman et Röhm, 1999). Ceci ne semble pas être le cas des acides 6-chloro-2-aminobenzoïque et 6-fluoro-2-aminobenzoïque dont l'inhibition peut être levée en présence d'AA. On distingue généralement les inhibiteurs réversibles, qui se lient à l'enzyme par des liaisons de faible énergie, et les inhibiteurs irréversibles, qui se fixent de manière covalente (Koolman et Röhm, 1999). Cependant, la liaison de l'enzyme avec son substrat est soupçonnée de s'effectuer au niveau de la fonction acyle des cétoacides, à l'aide d'un lien covalent.

Il serait intéressant de comprendre cette différence entre les trois analogues testés, comment et pourquoi l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque réagit différemment. Les inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs sont habituellement faciles à distinguer par la

vitesse maximale de la réaction enzymatique pour des concentrations élevées de substrats. Lorsque la vitesse maximale de la réaction ne change pas en présence d'un inhibiteur, il y a inhibition compétitive. Lorsque la vitesse diminue, il y a inhibition non compétitive (Koolman et Röhm, 1999). L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition Ki, qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le Ki est petit. Cette constante d'inhibition correspond aussi à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur (Koolman et Röhm, 1999). Il serait alors intéressant d'établir le niveau d'affinité des différents inhibiteurs testés pour PqsA, qui nous semble être la cible de ces molécules.

MvfR régule directement et indirectement tout un ensemble de facteurs de virulence. La présence d'analogues de l'AA dans le milieu de culture peut-elle affecter la virulence chez *P. aeruginosa*? À l'aide de la spectrophotométrie, le suivi de la production de la pyocyanine, contrôlée par MvfR, a été fait. Les cultures comparées à des D.O. semblables montrent qu'à une concentration de 1.5 mM, l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque diminue de 10 fois la présence de la pyocyanine dans le milieu. Toujours à une concentration de 1.5 mM, l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque diminue légèrement la production de la pyocyanine tandis que l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque ne semble pas affecter la production du pigment bleuté. Cependant, il a été démontré qu'à une concentration de 6 mM, le 6F et le 6Cl abolissent la production de la pyocyanine (Lesic *et al.*, soumis). Les gènes impliqués dans la synthèse de la pyocyanine, *phzABCDEFG*, ont été identifiés comme ayant leur expression diminuée par les trois analogues de l'AA (Lesic *et al.*, soumis).

Nous avons donc identifié trois composés efficaces dans l'inhibition du quorum sensing *in vitro* chez *P. aeruginosa*. La recherche de nouveaux analogues pourrait être nécessaire afin de trouver d'autres inhibiteurs actifs à de plus faibles concentrations. Bien sûr, l'identification de l'enzyme ciblé par ces analogues de l'AA pourrait contribuer au développement de nouvelles molécules.

4.3 Le régulateur transcriptionnel MvfR

MvfR est un régulateur transcriptionnel de la famille de type LysR (Henikoff *et al.*, 1988). Ces régulateurs transcriptionnels sont inactifs avant leur liaison à de petites molécules spécifiques appelées ligands ou co-inducteurs (Schell, 1993) et la partie C-terminale de MvfR code pour un domaine de liaison à un ligand (Cao *et al*, 2001). Cette famille de régulateurs transcriptionnels est reconnue pour faire la synthèse de leur propre inducteur. Les opérons *phnAB* et *pqsABCD* sont inactivés dans un mutant *mvfR* et comme ces opérons sont directement impliqués dans la synthèse des HAQ, nous avons émis l'hypothèse que les HAQ pourraient être des ligands de MvfR. Un mutant *mvfR* est également moins virulent, et on y observe une diminution de la production de la pyocyanine. De plus, le taux de survie est plus élevé chez les souris infectées avec un mutant *pqsA* comparativement à la souche sauvage (Déziel *et al.*, 2005). Ceci confirme donc l'importance des gènes dépendants de MvfR dans la pathogénèse. L'identification d'un co-inducteur de MvfR pourrait représenter une nouvelle cible dans le développement de nouveaux composés permettant de limiter les infections de *P. aeruginosa*.

Au cours de ce projet, il a été démontré que le PQS augmente l'affinité de MvfR pour son site de liaison à l'ADN (Wade *et al.*, 2005), une indication que le PQS pourrait bien être un ligand de MvfR. Cependant, il a été remarqué que la transcription de *pqsABCD* n'est pas affectée dans un mutant *pqsH* (Xiao *et al.*, 2006). Pourtant, un mutant *pqsH* ne produit pas de PQS, mais seulement du HHQ. Ceci indique donc qu'il pourrait bien y avoir deux ligands pour le site de liaison à MvfR.

Pour arriver à déterminer les ligands de MvfR, nous avons utilisé *E. coli* comme système hétérologue d'expression des HAQ. Ce système à permis de confirmer les éléments nécessaires et suffisants pour reconstituer la régulation de la biosynthèse des HAQ, c'est-à-dire *mvfR* ainsi que les gènes *pqsABCD*. Il a été remarqué que l'ajout d'acide anthranilique était nécessaire pour la production de HAQ chez *E. coli*. Ne possédant pas naturellement un système additionnel de biosynthèse de l'AA comme PhnAB, qui permet

une plus grande production d'AA utilisable pour la synthèse des HAQ, l'AA présent chez *E. coli* sert exclusivement à la synthèse du tryptophane (TrpEG), ce qui peut expliquer que dans cette construction l'AA soit en quantité limitante pour la synthèse des HAQ. Ce système à deux plasmides chez *E. coli* permet d'observer et de quantifier en CL/SM des congénères du HHQ possédant une chaîne alkyle en position 2 composée de 7, 9 et même de 11 carbones, tout comme chez la souche de *P. aeruginosa* PA14. On remarque une augmentation de la production de HHQ lors de l'ajout de PQS et de HHQ vers la fin de la phase exponentielle. L'effet d'induction se fait peu ou pas ressentir en début de la phase stationnaire. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation du HHQ dans le système, lequel n'est pas transformé en PQS en absence de l'enzyme PqsH. Les quantités de HHQ atteintes sont alors maximales et vraisemblablement le ligand est alors en concentration saturante. Cependant, le PQS semble avoir un effet plus marqué sur la production de ces HAQ.

Il reste à comprendre pourquoi MvfR aurait deux ligands. Le HHQ étant le précurseur du PQS est produit avant ce dernier. Il est possible qu'initialement le HHQ puisse initier la boucle d'autoinduction des HAQ en augmentant l'affinité de MvfR pour le promoteur de *pqsABCDE*. Par la suite la transformation du HHQ en PQS pourrait permettre une autre plus grande augmentation de la production des HAQ, compte tenu de la plus grande activité du PQS pour MvfR, dans un contexte de quorum sensing, dans la mesure où le PQS serait vu par les bactéries comme un produit « extracellulaire » reflétant une activité biologique (l'hydroxylation du HHQ) proportionnelle à l'augmentation de la densité cellulaire. Cette forte production de HAQ permettrait, via l'activation découlant de MvfR, l'expression coordonnée de facteurs de virulence utilisés par les bactéries pour submerger les défenses de l'hôte. De ce fait, l'utilisation de molécules capables de diminuer la production des HAQ au niveau enzymatique, agit également au niveau de l'expression des opérons *phnAB* et *pqsABCD*, par la diminution de la production du HHQ et du PQS qui sont les ligands de MvfR.

4.4 Recherche d'un intermédiaire de biosynthèse des HAQ

4.4.1 La chromatographie sur couche mince

Dans le but d'isoler un intermédiaire de biosynthèse des HAQ par chromatographie sur couche mince, nous avons utilisé l'AA marqué au C14. Le composé intermédiaire devrait être radioactif puisqu'il provient de la combinaison de l'acide anthranilique marqué et d'une céto acide. De plus, puisqu'elle contient un noyau aromatique, cette molécule doit être visible aux U.V, ce qui permet également de visualiser sa position. Une molécule non apparente sous la lampe U.V. serait plus difficile à localiser à partir de cultures non-radioactives, compte tenu que l'on ne peut pas injecter des composés radioactifs dans le spectromètre de masse en vue d'une identification plus poussée d'un éventuel produit isolé.

Afin d'augmenter la concentration de l'intermédiaire nous avons utilisé un mutant *pqsC* dans l'hypothèse que cette enzyme effectue une étape subséquente à l'addition de l'AA sur le cétoacide. Cependant, puisque ce mutant ne produit pas de PQS et que ce dernier, via l'activation de MvfR, augmente l'expression de l'opéron *pqsABCD* (Xiao *et al.*, 2006) nous avons rajouté du PQS non radioactif à ces cultures. En ajoutant du PQS dans le milieu de culture, on souhaite donc augmenter l'accumulation d'un intermédiaire chez au moins un des mutants testés. C'est pourquoi, chez *pqsA*$^-$, utilisé ici comme contrôle, et *pqsC*$^-$, on peut voir la marque du PQS sous les U.V. Cependant, on ne retrouve pas cette molécule au PhosphorImager. Le PQS n'est pas radioactif car il n'est pas produit par les mutants à partir de l'AA C14. La grande quantité de composés radioactifs retrouvés est explicable par le fait que l'AA est nécessaire à la biosynthèse du tryptophane. Comme le tryptophane est un acide aminé participant à la constitution des protéines, l'AA C14 est donc incorporé dans diverses voies métaboliques.

La chromatographie est une technique d'analyse pouvant être quantitative, qualitative et séparative. En plus des caractéristiques propres aux composés, la concentration des échantillons peut aussi influencer le déplacement des molécules. Le calcul du quotient Rf

(retention factor) qui est la distance parcourue par l'échantillon sur la distance parcourue par le solvant peut alors varier grandement selon les conditions expérimentales pour une même molécule. C'est ce qui semble s'être produit dans le cas du PQS et du composé recherché. Les Rf calculés varient beaucoup. Selon les différentes extractions effectuées, des quantités variables ont pu être extraites. Bien que les plaques chromatographiques utilisées puissent détecter quelques nanogrammes de matériel, normalement les échantillons varient entre 100 milligrammes et quelques microgrammes. Au-delà d'une certaine concentration, la qualité de la migration peut se détériorer, laisser des trainées et diminuer la séparation des composés d'un même extrait. Le Rf dépend donc de différents paramètres dont le système de solvants et la phase stationnaire, mais aussi de la quantité de matériel qui est apposé sur la plaque et de la température. À cause de ces facteurs variables, il est difficile de garder constant un Rf pour une même molécule. Un composé de référence est normalement ajouté aux extraits. Dans le cas de cette expérimentation, le PQS a pu servir de molécule référence. De plus, différentes molécules bien visibles aux U.V. et / ou au PhosphorImager ont servies de repères pour situer les molécules recherchées encerclées à la figure 3.28.

Les cultures correspondantes non radioactives ont été séparées par chromatographie sur plaque (fig. 3.29 et 3.30). L'absence de la molécule isolée sur les plaques radioactives chez les deux mutants peut s'expliquer de diverses manières. Les cultures ont des différences de D.O. variables. Il se peut que l'intermédiaire soit présent à une période très précise de la croissance bactérienne et donc à une D.O. bien définie, ce qui peut se traduire en une durée de vie très courte. L'extraction à l'acétate d'éthyle des cultures non-radioactives a été effectuée à une journée d'intervalle. Il se peut aussi que le composé d'intérêt ait été dégradé.

La récupération en 1^{ière} dimension des molécules non séparées en 2^{ième} dimension n'a pas permis de trouver de nouveaux intermédiaires éventuels dans la biosynthèse des HAQ. Il a déjà été mentionné que la récupération de matériel à partir de la silice de plaques chromatographiques comporte une grande part de pertes (Morrow *et al.*, 1999). C'est ce

qui semble s'être produit dans ce cas-ci (fig. 3.28). Beaucoup de matériel semble ne pas avoir été élué de la plaque de silice.

La séparation de la fraction cellulaire et du surnageant a permis d'avoir un peu moins de matériel sur les plaques. D'après la figure 3.33, le PQS est une molécule exportée majoritairement à l'extérieur de la cellule quoiqu'on en retrouve des traces à l'intérieur. La molécule recherchée est retrouvée dans le surnageant. Ceci est surprenant si l'on considère que ce composé est un intermédiaire et qu'il requiert des enzymes pour procéder à la cyclisation et former des HAQ. Cependant, chez les mutants, ces enzymes ne sont pas toutes présentes. Il se pourrait que le produit intermédiaire soit expulsé de la cellule s'il ne peut être réutilisé dans d'autres voies métaboliques par exemple. L'extraction à l'acétate d'éthyle des échantillons radioactifs et non radioactifs ainsi que la migration a eu lieu en même temps. La tache d'intérêt a été éluée des plaques non-radioactives mais l'identification en CL / SM n'a pas été possible. Encore une fois, l'élution à partir de la silice peut créer des pertes d'importantes quantités de produit. De ce fait, l'identification d'un composé inconnu en faible quantité par rapport au bruit de fond est très ardue.

L'extrait concentré sur plaque de CCM ainsi que l'élution d'une partie de la plaque à permis de retrouver la molécule d'intérêt, et cette fois-ci, très intense. L'identification en CL / SM n'a pas été possible, probablement à cause de la perte créé lors de l'élution de la silice.

4.4.2 L'électrophorèse sur gel non-dénaturant

L'isolation sur gel d'une protéine appartenant au système enzymatique *pqsABCD* a aussi été entreprise. De la même manière que lors des tests sur plaques chromatographiques, le milieu de culture des mutants a été supplémenté en AA C14. De cette manière, on souhaite observer l'accumulation d'un intermédiaire C14 lié à son ACP, dans l'hypothèse que l'intermédiaire cétoacide soit couplé à l'AA lorsque encore fixé a une ACP. Compte tenu que le lien thioester entre une ACP et son substrat est relativement labile, nous avons

recherché des conditions de dénaturation aussi douces que possible. Cependant, en utilisant des conditions ne favorisant pas le dépliement des protéines, celles-ci ont laissé des bandes peu distinctes les unes des autres. C'est pourquoi les extraits ont été séparés en fractions cytoplasmiques, membranaires ainsi que le surnageant. Cependant, la fraction cytoplasmique demeure celle possédant un contenu protéique très chargé. Nous n'avons pas observé de protéines marquées radioactivement. Il se peut que le lien covalent ait été rompu, malgré les conditions moins dénaturantes. Cependant, il est également possible que les protéines recherchées puissent se trouver en très faible quantité. C'est pourquoi le mutant *pqsA* a été transformé avec les plasmides multi-copies pLG12 et pLG14 pour surproduire ces ACP.

Le plasmide pLG12 permet l'expression constitutive des protéines PqsABCD. Selon le schéma de biosynthèse des HAQ, ces enzymes sont suffisantes pour produire des HAQ de la famille des HHQ. Le mutant *pqsA* comprenant le plasmide pLG12 ne peut donc pas accumuler un intermédiaire. Les gènes *pqsABCD* sont présents dans le plasmide. Il y a production de HAQ, une accumulation de produit HHQ. Le plasmide pLG14 contient les gènes *pqsABC* exprimés constitutivement. Une hypothèse serait que ces trois enzymes, une fois exprimées, puissent coupler l'AA (C14 dans cette expérience) et la cétoacide mais que l'enzyme PqsD étant manquante la réaction de cyclisation formant le noyau quinoline ne serait pas complétée. L'intermédiaire inachevé pourrait donc s'accumuler chez ce mutant. Il risque alors de se retrouver lié à une ou des protéines surexprimées impliquées dans la biosynthèse des HAQ. Le gel électrophorèse en conditions semi-dénaturantes n'a cependant pas permis de détecter la présence de protéines fortement radioactives malgré la surexpression des enzymes recherchées. Là encore, il se peut que le lien covalent liant l'intermédiaire à son ACP ait été rompu. Alternativement, il est possible que la protéine portant l'AA radioactif soit en concentration faible et que puisque l'AA est incorporé entre autre lors de la biosynthèse du tryptophane il en résulte un bruit de fond pour toutes les protéines qui masque le signal que nous recherchions. Il faut ajouter que les conditions d'électrophorèse utilisées sont non favorables à la séparation des protéines sur gel de polyacrylamide, les protéines membranaires n'ont pu être observées sur gel. Il serait important de rechercher les conditions d'électrophorèse

optimales afin de bien voir les protéines séparées tout en ayant les conditions de dénaturation les plus douces possible pour éviter la rupture du lien thioester entre l'ACP et son substrat.

Conclusion

Le projet de recherche proposé vise à décortiquer le système enzymatique codé par les gènes *pqsA-D* qui semblent responsables de la synthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. Le PQS est un HAQ impliqué dans la hiérarchie du quorum sensing, un important mécanisme du contrôle de la virulence chez *P. aeruginosa.* Des inhibiteurs du quorum sensing sont activement recherchés en tant que nouveaux traitements contre ce microorganisme en alternative aux antibiotiques classiques (Hentzer *et al.*, 2003). D'ailleurs, il a été démontré que l'anthranilate de méthyle, un analogue structurel de l'acide anthranilique, inhibe la formation de PQS tout en diminuant l'expression de facteurs de virulence (Calfee *et al.*, 2001). Ceci serait dû à l'inhibition de l'activité de PqsA, que l'on soupçonne être l'enzyme responsable de l'activation de la fonction carbonyle de l'acide anthranilique lors de la formation des HAQ.

Trois volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord, l'inhibition de la production des HAQ à l'aide d'inhibiteurs partageant une similarité structurelle avec l'acide anthranilique. Trois molécules semblent prometteuses : l'acide 4-chloro-2-aminobenzoïque, l'acide 6-chloro-2-aminobenzoïque et l'acide 6-fluoro-2-aminobenzoïque. Ces molécules arrivent à inhiber la production de HHQ, de PQS et de N-oxide en culture liquide et ce en affectant peu la croissance bactérienne. Le fait que le 4Cl, le 6Cl ainsi que le 6F, soient capables d'inhiber la synthèse des N-oxides et des autres HAQ suggère que ces analogues de l'AA inhibent une enzyme commune aux deux voies de biosynthèse. Les trois inhibiteurs ne semblent pas agir au niveau de la synthèse de l'AA. L'accumulation transitoire de l'acide anthranilique dans les extraits de PA14 mis en culture avec le 4Cl, le 6Cl ou le 6F est semblable à l'accumulation observée chez le mutant *pqsA*. Cependant, les inhibiteurs ne semblent pas agir de la même façon. Tandis que le 6Cl et le 6F semblent compétitionner pour le site actif de l'enzyme PqsA, on ne remarque pas d'effet de compétition chez le 4Cl. De plus, l'effet inhibiteur peut être levé en présence d'AA pour ce qui est du 6Cl et du 6F. Bien sûr, l'isolement et la caractérisation de l'enzyme ciblé par ces analogues de l'AA pourrait contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs.

La deuxième partie de l'étude concerne l'identification d'une seconde molécule pouvant agir en tant que co-inducteur de MvfR, régulateur transcriptionnel du système de quorum sensing. Nous savons que l'activation de MvfR dépend de sa liaison à un co-inducteur spécifique, possiblement un produit d'un chemin de biosynthèse régulé par MvfR et relié à la virulence de la bactérie (Schell, 1993). Il a d'ailleurs été rapporté que le PQS augmente l'affinité de MvfR à l'ADN (Wade *et al.*, 2005). Nous avons démontré que le HHQ ainsi que le PQS sont tous deux des co-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR. Cependant, l'activation de MvfR par le PQS semble avoir un effet plus important que le HHQ qui augmenterait la production des HAQ en début de phase exponentielle alors que le PQS agirait au début de phase stationnaire. Il reste à comprendre pourquoi MvfR possède deux ligands.

Finalement, nous avons cherché à isoler un intermédiaire ainsi qu'une protéine de type acyl carrier protein afin d'élucider le chemin de biosynthèse des HAQ chez *P. aeruginosa* PA14. Nous savons que l'acide anthranilique se couple à des acides gras substitués en position bêta par une fonction cétone. Le composé intermédiaire subit ensuite une réaction de cyclisation pour former le noyau quinoline commun aux HAQ. Vraisemblablement cette cyclisation s'effectue par l'activation de la fonction carbonyle de l'acide anthranilique, qui serait attaquée par la fonction méthylène adjacente aux groupements acide et cétonique du cétoacide. Le gène *pqsA*, de l'opéron *pqsABCD*, est responsable de la synthèse des HAQ et présente des similarités de séquences avec des protéines responsables de l'activation de la fonction carboxyle de composés aromatiques. Nous avons utilisé la technique de chromatographie sur couche mince pour analyser les mutants p*qsA* et *C* (fig. 3.28 et suivantes). Il n'a pas été possible d'isoler un intermédiaire de biosynthèse, probablement à cause de sa courte durée de vie. L'isolation sur gel d'une protéine appartenant au système enzymatique *pqsABCD* en utilisant de l'AA radioactif a été entreprise avec des résultats peu concluants. L'acide anthranilique étant incorporé entre autre lors de la biosynthèse du tryptophane, il en résulte un bruit de fond pour toutes les protéines qui masquera le signal recherché. L'utilisation d'un inhibiteur radioactif de la biosynthèse des HAQ pourrait éliminer un tel problème.

En perspectives, l'identification de la fonction de chacune des enzymes responsables de la synthèse des HAQ est importante dans le développement d'une nouvelle méthode pour combattre les infections à *P. aeruginosa*. L'utilisation d'inhibiteurs semble prometteuse, ciblant la virulence de la bactérie et non la survie de celle-ci. Ceci pourrait permettre au système immunitaire de l'hôte d'éliminer le microorganisme et ce, tout en évitant la résistance attribuable aux antibiotiques. Cependant, il est évident que beaucoup d'étapes restent à franchir afin de bien comprendre le mode d'action de ces inhibiteurs. De plus, de nouvelles techniques doivent être développées pour y arriver, dont l'isolation d'un intermédiaire de biosynthèse qui est toujours inconnu et l'isolation des enzymes nécessaires à la biosynthèse des HAQ pouvant mener à la découverte de nouveaux inhibiteurs encore plus efficaces.

Références

Albus, A.M., E.C. Pesci, L.J. Runyen-Janecky, S.E. West et B.H. Iglewski. 1997. «Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 179, no. 12, p. 3928-3935.

Archibald, L.K. et R.P. Gaynes. 1997. «Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons». Infect Dis Clin North Am, v. 11, no. 2, p. 245-255.

Azghani, A.O., S. Idell, M. Bains et R.E. Hancock. 2002. «*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture». Microb Pathog, v. 33, no. 3, p. 109-114.

Bainton, N.J., P. Stead, S.R. Chhabra, B.W. Bycroft, G.P. Salmond, G.S. Stewart et P. Williams. 1992. «N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*». Biochem J, v. 288 (Pt 3), p. 997-1004.

Barbieri, J.T. 2000. «Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin». Int J Med Microbiol, v. 290, no. 4-5, p. 381-387.

Baron, S.S. et J.J. Rowe. 1981. «Antibiotic action of pyocyanin». Antimicrob Agents Chemother, v. 20, no. 6, p. 814-820.

Basustaoglu, A.C., H. Gun, M.A. Saracli, M. Baysallar et T. Haznedaroglu. 1995. «Development of resistance to imipenem among nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*». Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v. 14, no. 5, p. 469-470.

Beare, P.A., R.J. For, L.W. Martin et I.L. Lamont. 2003. «Siderophore-mediated cell signalling in Pseudomonas aeruginosa: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis». Mol Microbiol, v. 47, no. 1, p. 195-207.

Betley, M.J., V.L. Miller et J.J. Mekalanos. 1986. «Genetics of bacterial enterotoxins». Annu Rev Microbiol, v. 40, p. 577-605.

Beveridge, T.J., S.A. Makin, J.L. Kadurugamuwa et Z. Li. 1997. «Interactions between biofilms and the environment». FEMS Microbiol Rev, v. 20, no. 3-4, p. 291-303.

Bjarnsholt, T., P.O. Jensen, T.B. Rasmussen, L. Christophersen, H. Calum, M. Hentzer, H.P. Hougen, J. Rygaard, C. Moser, L. Eberl, N. Hoiby et M. Givskov. 2005. «Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections». Microbiology, v. 151, no. Pt 12, p. 3873-3880.

Blackwood, L.L., R.M. Stone, B.H. Iglewski et J.E. Pennington. 1983. «Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection». Infect Immun, v. 39, no. 1, p. 198-201.

Bodey, G.P., R. Bolivar, V. Fainstein et L. Jadeja. 1983. «Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*». Rev Infect Dis, v. 5, no. 2, p. 279-313.

Bredenbruch, F., M. Nimtz, V. Wray, M. Morr, R. Muller et S. Haussler. 2005. «Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines». J Bacteriol, v. 187, no. 11, p. 3630-3635.

Brenner, D.J., J.T. Staley et N.R. Krieg, 2001, Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation., *in* D. R. Boon, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity, eds., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 1: New York, Springer-Verlag, p. 27-31.

Brint, J.M. et D.E. Ohman. 1995. «Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family». J Bacteriol, v. 177, no. 24, p. 7155-7163.

Britigan, B.E., T.L. Roeder, G.T. Rasmussen, D.M. Shasby, M.L. McCormick et C.D. Cox. 1992. «Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for Pseudomonas-associated tissue injury». J Clin Invest, v. 90, no. 6, p. 2187-2196.

Brito, N., M.A. Falcon, A. Carnicero, A.M. Gutierrez-Navarro et T.B. Mansito. 1989. «Purification and peptidase activity of a bacteriolytic extracellular enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*». Res Microbiol, v. 140, no. 2, p. 125-137.

Burwen, D.R., S.N. Banerjee et R.P. Gaynes. 1994. «Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System». J Infect Dis, v. 170, no. 6, p. 1622-1625.

Caldwell, D.E. 2002. «The calculative nature of microbial biofilms and bioaggregates». Int Microbiol, v. 5, no. 3, p. 107-116.

Calfee, M.W., J.P. Coleman et E.C. Pesci. 2001. «Interference with *Pseudomonas quinolone* signal synthesis inhibits virulence factor expression by Pseudomonas aeruginosa». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, no. 20, p. 11633-11637.

Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins et L.G. Rahme. 2001. «A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, no. 25, p. 14613-14618.

Carlier, A., S. Uroz, B. Smadja, R. Fray, X. Latour, Y. Dessaux et D. Faure. 2003. «The Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also

encoding N-Acyl homoserine lactonase activity». Appl Environ Microbiol, v. 69, no. 8, p. 4989-4993.

Carmeli, Y., N. Troillet, G.M. Eliopoulos et M.H. Samore. 1999a. «Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents». Antimicrob Agents Chemother, v. 43, no. 6, p. 1379-1382.

Carmeli, Y., N. Troillet, A.W. Karchmer et M.H. Samore. 1999b. «Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*». Arch Intern Med, v. 159, no. 10, p. 1127-1132.

Chapon-Herve, V., M. Akrim, A. Latifi, P. Williams, A. Lazdunski et M. Bally. 1997. «Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*». Mol Microbiol, v. 24, no. 6, p. 1169-1178.

Chugani, S.A., M. Whiteley, K.M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil et E.P. Greenberg. 2001. «QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, no. 5, p. 2752-2757.

Coin, D., D. Louis, J. Bernillon, M. Guinand et J. Wallach. 1997. «LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods». FEMS Immunol Med Microbiol, v. 18, no. 3, p. 175-184.

Collier, D.N., L. Anderson, S.L. McKnight, T.L. Noah, M. Knowles, R. Boucher, U. Schwab, P. Gilligan et E.C. Pesci. 2002. «A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients». FEMS Microbiol Lett, v. 215, no. 1, p. 41-46.

Cornforth, J.W. et A.T. James. 1956. «Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin». Biochem J, v. 63, no. 1, p. 124-130.

Costerton, J.W., K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta et T.J. Marrie. 1987. «Bacterial biofilms in nature and disease». Annu Rev Microbiol, v. 41, p. 435-464.

Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber et H.M. Lappin-Scott. 1995. «Microbial biofilms». Annu Rev Microbiol, v. 49, p. 711-745.

Costerton, J.W., P.S. Stewart et E.P. Greenberg. 1999. «Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections». Science, v. 284, no. 5418, p. 1318-1322.

Cox, C.D. et J. Parker. 1979. «Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*». J Clin Microbiol, v. 9, no. 4, p. 479-484.

Cruickshank, C.N. et E.J. Lowbury. 1953. «The effect of pyocyanin on human skin cells and leucocytes». Br J Exp Pathol, v. 34, no. 6, p. 583-587.

Cunha, B.A. 2002. «*Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy». Semin Respir Infect, v. 17, no. 3, p. 231-239.

D'Argenio, D.A., M.W. Calfee, P.B. Rainey et E.C. Pesci. 2002. «Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants». J Bacteriol, v. 184, no. 23, p. 6481-6489.

Davey, M.E., N.C. Caiazza et G.A. O'Toole. 2003. «Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1». J Bacteriol, v. 185, no. 3, p. 1027-1036.

Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton et E.P. Greenberg. 1998. «The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm». Science, v. 280, no. 5361, p. 295-298.

Dawson, V.L., H.P. Brahmbhatt, J.A. Mong et T.M. Dawson. 1994. «Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures». Neuropharmacology, v. 33, no. 11, p. 1425-1430.

de Bentzmann, S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M.C. Plotkowski et E. Puchelle. 1996. «Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells». Infect Immun, v. 64, no. 5, p. 1582-1588.

de Kievit, T., P.C. Seed, J. Nezezon, L. Passador et B.H. Iglewski. 1999. «RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 181, no. 7, p. 2175-2184.

de Kievit, T.R. et B.H. Iglewski. 2000. «Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships». Infect Immun, v. 68, no. 9, p. 4839-4849.

de Kievit, T.R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown et B.H. Iglewski. 2001. «Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns». Appl Environ Microbiol, v. 67, no. 4, p. 1865-1873.

de Nys R., A.D. Wright, G.M. König et O. Sticher. 1993. «New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra*». Tetrahedron, v.49, p. 11213–11220.

de Nys R., P.D. Steinberg, P. Willemsen, S.A. Dworjanyn, C.L. Gabelish et R.J. King. 1995. «Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays». Biofouling, v. 8, p. 259–271.

de Nys R, Dworjanyn S and Steinberg PD (2002) «A new method for quantification of surface borne algal secondary metabolites». Mar Ecol Prog Ser, v. 162, p. 79–87.

Déziel, E., F. Lépine, S. Milot et R. Villemur. 2003. «rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids». Microbiology, v. 149, no. Pt 8, p. 2005-2013.

Déziel, E., F. Lépine, S. Milot, J. He, M.N. Mindrinos, R.G. Tompkins et L.G. Rahme. 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, v. 101, no. 5, p. 1339-1344.

Déziel, E., S. Gopalan, A.P. Tampakaki, F. Lépine, K.E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao et L.G. Rahme. 2005. «The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones». Mol Microbiol, v. 55, no. 4, p. 998-1014.

Dickinson, G.M. et A.L. Bisno. 1993. «Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations». Int J Artif Organs, v. 16, no. 11, p. 749-754.

Diggle, S.P., K. Winzer, S.R. Chhabra, K.E. Worrall, M. Camara et P. Williams. 2003. «The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR». Mol Microbiol, v. 50, no. 1, p. 29-43.

DiMango, E., H.J. Zar, R. Bryan et A. Prince. 1995. «Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8». J Clin Invest, v. 96, no. 5, p. 2204-2210.

Dong, Y.H., A.R. Gusti, Q. Zhang, J.L. Xu et L.H. Zhang. 2002. «Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from Bacillus species». Appl Environ Microbiol, v. 68, no. 4, p. 1754-1759.

Doring, G., H.J. Obernesser et K. Botzenhart. 1981. «[Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA (author's transl)]». Zentralbl Bakteriol A, v. 249, no. 1, p. 89-98.

Duong, F., E. Bonnet, V. Geli, A. Lazdunski, M. Murgier et A. Filloux. 2001. «The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system». Gene, v. 262, no. 1-2, p. 147-153.

Dworjanyn S., R. de Nys et P.D. Steinberg. 1999. «Localization of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*». Mar Biol, v.133, p. 727–736.

Espinosa-Urgel, M. 2003. «Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms». J Bacteriol, v. 185, no. 3, p. 699-700.

Essar, D.W., L. Eberly, A. Hadero et I.P. Crawford. 1990a. «Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications». J Bacteriol, v. 172, no. 2, p. 884-900.

Essar, D.W., L. Eberly, C.Y. Han et I.P. Crawford. 1990b. «DNA sequences and characterization of four early genes of the tryptophan pathway in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 172, no. 2, p. 853-866.

Estrellas, P.S., Jr., L.G. Alionte et J.A. Hobden. 2000. «A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient». Curr Eye Res, v. 20, no. 3, p. 157-165.

Evans, L.R. et A. Linker. 1973. «Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 116, no. 2, p. 915-924.

Fabian, T.C. 2000. «Empiric therapy for pneumonia in the surgical intensive care unit». Am J Surg, v. 179, no. 2A Suppl, p. 18S-23S; discussion 24S-25S.

Fast, W. 2003. «Molecular radio jamming: autoinducer analogs». Chem Biol, v. 10, no. 1, p. 1-2.

Favre-Bonte, S., J.C. Pache, J. Robert, D. Blanc, J.C. Pechere et C. van Delden. 2002. «Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients». Microb Pathog, v. 32, no. 3, p. 143-147.

Favre-Bonte, S., T. Kohler et C. Van Delden. 2003. «Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin». J Antimicrob Chemother, v. 52, no. 4, p. 598-604.

Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang et A. Prince. 1998. «Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection». Infect Immun, v. 66, no. 1, p. 43-51.

Filloux, A., G. Michel et M. Bally. 1998. «GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*». FEMS Microbiol Rev, v. 22, no. 3, p. 177-198.

Fink, M.P., D.R. Snydman, M.S. Niederman, K.V. Leeper, Jr., R.H. Johnson, S.O. Heard, R.G. Wunderink, J.W. Caldwell, J.J. Schentag, G.A. Siami et et al. 1994. «Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. The Severe Pneumonia Study Group». Antimicrob Agents Chemother, v. 38, no. 3, p. 547-557.

Finlay, B.B. et S. Falkow. 1989. «Common themes in microbial pathogenicity». Microbiol Rev, v. 53, no. 2, p. 210-230.

Finlay, B.B. et S. Falkow. 1997. «Common themes in microbial pathogenicity revisited». Microbiol Mol Biol Rev, v. 61, no. 2, p. 136-169.

FitzSimmons, S.C. 1993. «The changing epidemiology of cystic fibrosis». J Pediatr, v. 122, no. 1, p. 1-9.

Frank, L.H. et R.D. Demoss. 1959. «On the biosynthesis of pyocyanine». J Bacteriol, v. 77, no. 6, p. 776-782.

Frederiksen, B., C. Koch et N. Hoiby. 1997. «Antibiotic treatment of initial colonization with Pseudomonas aeruginosa postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis». Pediatr Pulmonol, v. 23, no. 5, p. 330-335.

Fridkin, S.K., H.A. Hill, N.V. Volkova, J.R. Edwards, R.M. Lawton, R.P. Gaynes et J.E. McGowan, Jr. 2002. «Temporal changes in prevalence of antimicrobial resistance in 23 US hospitals». Emerg Infect Dis, v. 8, no. 7, p. 697-701.

Fridovich, I. 1978. «The biology of oxygen radicals». Science, v. 201, no. 4359, p. 875-880.

Fuqua, C., M.R. Parsek et E.P. Greenberg. 2001. «Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing». Annu Rev Genet, v. 35, p. 439-468.

Fuqua, W.C. et S.C. Winans. 1994. «A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite». J Bacteriol, v. 176, no. 10, p. 2796-2806.

Fuqua, W.C., S.C. Winans et E.P. Greenberg. 1994. «Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators». J Bacteriol, v. 176, no. 2, p. 269-275.

Fuqua, C., S.C. Winans et E.P. Greenberg. 1996. «Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators». Annu Rev Microbiol, v. 50, p. 727-751.

Gallagher, L.A., S.L. McKnight, M.S. Kuznetsova, E.C. Pesci et C. Manoil. 2002. «Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 184, no. 23, p. 6472-6480.

Galloway, D.R. 1991. «*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments». Mol Microbiol, v. 5, no. 10, p. 2315-2321.

Gambello, M.J., S. Kaye et B.H. Iglewski. 1993. «LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression». Infect Immun, v. 61, no. 4, p. 1180-1184.

Gang, R.K., R.L. Bang, S.C. Sanyal, E. Mokaddas et A.R. Lari. 1999. «*Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in burns». Burns, v. 25, no. 7, p. 611-616.

Geisenberger, O., M. Givskov, K. Riedel, N. Hoiby, B. Tummler et L. Eberl. 2000. «Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis». FEMS Microbiol Lett, v. 184, no. 2, p. 273-278.

Ghigo, J.M. 2001. «Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development». Nature, v. 412, no. 6845, p. 442-445.

Gibson, R. L., J. L. Burns et B. W. Ramsey. 2003. «Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. » Am J Respir Crit Care Med, v168, 918-951.

Gilboa-Garber, N., D. Sudakevitz, M. Sheffi, R. Sela et C. Levene. 1994. « PA-I and PA-II lectin interactions with the ABO(H) and P blood group glycosphingolipid antigens may contribute to the broad spectrum adherence of Pseudomonas aeruginosa to human tissues in secondary infections». Glycoconj J. v. 11, no.5, p 414-417.

Givskov, M., R. de Nys, M. Manefield, L. Gram, R. Maximilien, L. Eberl, S. Molin, P.D. Steinberg et S. Kjelleberg. 1996. «Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling». J Bacteriol, v. 178, no. 22, p. 6618-6622.

Good, L., S.K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson et P.E. Nielsen. 2001. «Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates». Nat Biotechnol, v. 19, no. 4, p. 360-364.

Govan, J.R. et V. Deretic. 1996. «Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*». Microbiol Rev, v. 60, no. 3, p. 539-574.

Haas, B., E. Murphy et D. Castignetti. 1991. «Siderophore synthesis by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients». Can J Microbiol, v. 37, no. 8, p. 654-657.

Hahn, H.P. 1997. «The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*: a review». Gene, v. 192, no. 1, p. 99-108.

Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton et P. Stoodley. 2004. «Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases». Nat Rev Microbiol, v. 2, no. 2, p. 95-108.

Hamood, A.N., J. Griswold et J. Colmer. 1996. «Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*». Infect Immun, v. 64, no. 8, p. 3154-3160.

Harris, A.D., D. Smith, J.A. Johnson, D.D. Bradham et M.C. Roghmann. 2002. «Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients». Clin Infect Dis, v. 34, no. 3, p. 340-345.

Hart, T. et P. Shears, 1997, Atlas de poche de microbiologie: Médecine-Sciences: Paris, Flammarion, 314 p.

Harth, G., P.C. Zamecnik, J.Y. Tang, D. Tabatadze et M.A. Horwitz. 2000. «Treatment of Mycobacterium tuberculosis with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, no. 1, p. 418-423.

Häse, C.C. et J.J. Mekalanos. 1999. «Effects of changes in membrane sodium flux on virulence gene expression in *Vibrio cholerae*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, no. 6, p. 3183-3187.

Hays, E.E., I.C. Wells, P.A. Katzman, C.K. Cain, F.A. Jacobs, S.A. Thayer, E.A. Doisy, W.L. Gaby, E.C. Roberts, R.D. Muir, C.J. Carroll, L.R. Jones et N.J. Wade. 1945. «Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*». J Biol Chem, v. 159, p. 725-750.

Heck, L.W., K. Morihara, W.B. McRae et E.J. Miller. 1986. «Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase». Infect Immun, v. 51, no. 1, p. 115-118.

Heck, L.W., K. Morihara et D.R. Abrahamson. 1986. «Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease». Infect Immun, v. 54, no. 1, p. 149-153.

Heck, L.W., P.G. Alarcon, R.M. Kulhavy, K. Morihara, M.W. Russell et J.F. Mestecky. 1990. «Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase». J Immunol, v. 144, no. 6, p. 2253-2257.

Held, W.A. et O.H. Smith. 1970. «Mechanism of 3-methylanthranilic acid derepression of the tryptophan operon in *Escherichia coli*». J Bacteriol, v. 101, no. 1, p. 209-217.

Henikoff, S., G.W. Haughn, J.M. Calvo et J.C. Wallace. 1988. «A large family of bacterial activator proteins». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 85, no. 18, p. 6602-6606.

Hentzer, M., K. Riedel, T.B. Rasmussen, A. Heydorn, J.B. Andersen, M.R. Parsek, S.A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg et M. Givskov. 2002. «Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound». Microbiology, v. 148, no. Pt 1, p. 87-102.

Hentzer, M. et M. Givskov. 2003. «Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections». J Clin Invest, v. 112, no. 9, p. 1300-1307.

Hentzer, M., H. Wu, J.B. Andersen, K. Riedel, T.B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M.A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J.W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby et M. Givskov. 2003. «Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors». Embo J, v. 22, no. 15, p. 3803-3815.

Hirakata, Y., N. Furuya, T. Matsumoto, K. Tateda et K. Yamaguchi. 1995. «Influence of various immunosuppressive agents on the occurrence of endogenous bacteraemia in mice». J Med Microbiol, v. 42, no. 3, p. 181-185.

Hoang, T.T. et H.P. Schweizer. 1999. «Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis». J Bacteriol, v. 181, no. 17, p. 5489-5497.

Hoang, T.T., S.A. Sullivan, J.K. Cusick et H.P. Schweizer. 2002. «Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths». Microbiology, v. 148, no. Pt 12, p. 3849-3856.

Hobden, J.A. 2002. «*Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence». DNA Cell Biol, v. 21, no. 5-6, p. 391-396.

Hoiby, N., H. Krogh Johansen, C. Moser, Z. Song, O. Ciofu et A. Kharazmi. 2001. «*Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth». Microbes Infect, v. 3, no. 1, p. 23-35.

Holder, I.A. et R. Wheeler. 1984. «Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa*: elastase, an IgG protease». Can J Microbiol, v. 30, no. 9, p. 1118-1124.

Hughes, M.G., H.L. Evans, T.W. Chong, R.L. Smith, D.P. Raymond, S.J. Pelletier, T.L. Pruett et R.G. Sawyer. 2004. «Effect of an intensive care unit rotating empiric antibiotic schedule on the development of hospital-acquired infections on the non-intensive care unit ward». Crit Care Med, v. 32, no. 1, p. 53-60.

Jaffar-Bandjee, M.C., A. Lazdunski, M. Bally, J. Carrere, J.P. Chazalette et C. Galabert. 1995. «Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*». J Clin Microbiol, v. 33, no. 4, p. 924-929.

Ji, Y., B. Zhang, S.F. Van, Horn, P. Warren, G. Woodnutt, M.K. Burnham et M. Rosenberg. 2001. «Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA». Science, v. 293, no. 5538, p. 2266-2269.

Johnson, M.K. et D. Boese-Marrazzo. 1980. «Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*». Infect Immun, v. 29, no. 3, p. 1028-1033.

Jones, S., B. Yu, N.J. Bainton, M. Birdsall, B.W. Bycroft, S.R. Chhabra, A.J. Cox, P. Golby, P.J. Reeves, S. Stephens et et al. 1993. «The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in Erwinia carotovora and *Pseudomonas aeruginosa*». Embo J, v. 12, no. 6, p. 2477-2482.

Juhas, M., L. Eberl et B. Tummler. 2005. «Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*». Environ Microbiol, v. 7, no. 4, p. 459-471.

Kernacki, K.A., J.A. Hobden, L.D. Hazlett, R. Fridman et R.S. Berk. 1995. «In vivo bacterial protease production during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection». Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 36, no. 7, p. 1371-1378.

Kessler, E., M. Safrin, W.R. Abrams, J. Rosenbloom et D.E. Ohman. 1997. «Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA». J Biol Chem, v. 272, no. 15, p. 9884-9889.

Kiewitz, C., C. Weinel et B. Tummler. 2002. «Genome codon index of *Pseudomonas aeruginosa*: A codon index that utilizes whole genome sequence data». Genome Lett., v. 1, p. 61-70.

Kline, T., J. Bowman, B.H. Iglewski, T. de Kievit, Y. Kakai et L. Passador. 1999. «Novel synthetic analogs of the *Pseudomonas* autoinducer». Bioorg Med Chem Lett, v. 9, no. 24, p. 3447-3452.

Koolman, J. et K. Röhm, -H., 1999, Atlas de poche de biochimie: Médecine-Sciences: Paris, Flammarion, 462 p.

Kownatzki, R., B. Tummler et G. Doring. 1987. «Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients». Lancet, v. 1, no. 8540, p. 1026-1027.

Kulasekara, B.R. et S. Lory, 2004, The genome of *Pseudomonas aeruginosa*, *in* J.-L. Ramos, ed., Pseudomonas, v. 1: New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, p. 835.

Kurreck, J. 2003. «Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications». Eur J Biochem, v. 270, no. 8, p. 1628-1644.

Lache, M., W.R. Hearn, J.W. Zyskind, D.J. Tipper et J.L. Strominger. 1969. «Specificity of a bacteriolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 100, no. 1, p. 254-259

Laemmli, U.K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». Nature, v. 15 no. 227, p. 680-685

Lamont, I.L., P.A. Beare, U. Ochsner, A.I. Vasil et M.L. Vasil. 2002. «Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, no. 10, p. 7072-7077.

Latifi, A., M.K. Winson, M. Foglino, B.W. Bycroft, G.S. Stewart, A. Lazdunski et P. Williams. 1995. «Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1». Mol Microbiol, v. 17, no. 2, p. 333-343.

Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams et A. Lazdunski. 1996. «A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS». Mol Microbiol, v. 21, no. 6, p. 1137-1146.

Leadbetter, J.R. et E.P. Greenberg. 2000. «Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*». J Bacteriol, v. 182, no. 24, p. 6921-6926.

Lépine, F., E. Déziel, S. Milot et L.G. Rahme. 2003. «A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures». Biochim Biophys Acta, v. 1622, no. 1, p. 36-41.

Lépine, F., S. Milot, E. Déziel, J. He et L.G. Rahme. 2004. «Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*». J Am Soc Mass Spectrom, v. 15, no. 6, p. 862-869.

Lerat, E. et N.A. Moran. 2004. «The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria». Mol Biol Evol, v. 21, no. 5, p. 903-913.

Lesprit, P., F. Faurisson, O. Join-Lambert, F. Roudot-Thoraval, M. Foglino, C. Vissuzaine et C. Carbon. 2003. «Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats». Am J Respir Crit Care Med, v. 167, no. 11, p. 1478-1482.

Letoffe, S., V. Redeker et C. Wandersman. 1998. «Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore». Mol Microbiol, v. 28, no. 6, p. 1223-1234.

Lightbown, J.W. 1954. «An antagonist of streptomycin and dihydrostreptomycin produced by *Pseudomonas aeruginosa*». J Gen Microbiol, v. 11, no. 3, p. 477-492.

Lightbown, J.W. et F.L. Jackson. 1956. «Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides». Biochem J, v. 63, no. 1, p. 130-137.

Lin, Y.H., J.L. Xu, J. Hu, L.H. Wang, S.L. Ong, J.R. Leadbetter et L.H. Zhang. 2003. «Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes». Mol Microbiol, v. 47, no. 3, p. 849-860.

Liu, P.V. 1974. «Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*». J Infect Dis, v. 130 Suppl, no. 0, p. S94-99.

Louis, D., P. Sorlier et J. Wallach. 1998. «Quantitation and enzymatic activity of the alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* in culture supernatants from clinical strains». Clin Chem Lab Med, v. 36, no. 5, p. 295-298.

Lyczak, J.B., C.L. Cannon et G.B. Pier. 2002. «Lung infections associated with cystic fibrosis». Clin Microbiol Rev, v. 15, no. 2, p. 194-222.

Lynch, J.P., 3rd. 2001. «Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment». Chest, v. 119, no. 2 Suppl, p. 373S-384S.

Machan, Z.A., G.W. Taylor, T.L. Pitt, P.J. Cole et R. Wilson. 1992. «2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*». J Antimicrob Chemother, v. 30, no. 5, p. 615-623.

Madhavarao, C.N., Chinopuolos, C., Chandrasekaran, K., Namboodiri, M.A. «Characterization of the N-acetylaspartate biosynthetic enzyme from rat brain». J Neurochem, v. 86, no.4, p. 824-835.

Mahajan-Miklos, S., L.G. Rahme et F.M. Ausubel. 2000. «Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts». Mol Microbiol, v. 37, no. 5, p. 981-988.

Maier, R.M. et G. Soberon-Chavez. 2000. «*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications». Appl Microbiol Biotechnol, v. 54, no. 5, p. 625-633.

Makin, S.A. et T.J. Beveridge. 1996. «The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces». Microbiology, v. 142 (Pt 2), p. 299-307.

Manfredi, R., A. Nanetti, M. Ferri et F. Chiodo. 2000. «*Pseudomonas spp.* complications in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey». Eur J Epidemiol, v. 16, no. 2, p. 111-118.

Manian, F.A., L. Meyer, J. Jenne, A. Owen et T. Taff. 1996. «Loss of antimicrobial susceptibility in aerobic gram-negative bacilli repeatedly isolated from patients in intensive-care units». Infect Control Hosp Epidemiol, v. 17, no. 4, p. 222-226.

Matsui, H., B.R. Grubb, R. Tarran, S.H. Randell, J.T. Gatzy, C.W. Davis et R.C. Boucher. 1998. «Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease». Cell, v. 95, no. 7, p. 1005-1015.

Maximilien R., R. de Nys, C. Holmstrom, L. Gram, M. Givskov, K. Crass, S. Kjelleberg et P. Steinberg. 1998. «Chemical mediation of bacterial surface colonisation by sendary metabolites of the red alga *Delisea pulchra*». Aquat Microb Ecol, v. 15, p. 233–246.

McClure, C.D. et N.L. Schiller. 1992. «Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages». J Leukoc Biol, v. 51, no. 2, p. 97-102.

McGrath, S., D.S. Wade et E.C. Pesci. 2004. «Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the Pseudomonas quinolone signal (PQS)». FEMS Microbiol Lett, v. 230, no. 1, p. 27-34.

McKnight, S.L., B.H. Iglewski et E.C. Pesci. 2000. «The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 182, no. 10, p. 2702-2708.

Meyer, J.M., A. Neely, A. Stintzi, C. Georges et I.A. Holder. 1996. «Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*». Infect Immun, v. 64, no. 2, p. 518-523.

Middleton, B., H.C. Rodgers, M. Camara, A.J. Knox, P. Williams et A. Hardman. 2002. «Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum». FEMS Microbiol Lett, v. 207, no. 1, p. 1-7.

Milatovic, D. et I. Braveny. 1987. «Development of resistance during antibiotic therapy». Eur J Clin Microbiol, v. 6, no. 3, p. 234-244.

Molin, S. et T. Tolker-Nielsen. 2003. «Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure». Curr Opin Biotechnol, v. 14, no. 3, p. 255-261.

Morihara, K., H. Tsuzuki, M. Harada et T. Iwata. 1984. «Purification of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor and its inactivation by *Pseudomonas aeruginosa* elastase». J Biochem (Tokyo), v. 95, no. 3, p. 795-804.

Morrow, J.D., W.E. Zackert, J.P. Yang, E.H. Kurhts, D. Callewaert, R. Dworski, K. Kanai, D. Taber, K. Moore, J.A. Oates et L.J. Roberts. 1999. «Quantification of the major urinary metabolite of 15-F2t-isoprostane (8-iso-PGF2alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay». Anal Biochem, v. 269, no. 2, p. 326-331.

Moyed, H.S. 1960. «False feedback inhibition: inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan». J Biol Chem, v. 235, p. 1098-1102.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. 2004. «Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004». Am J Infect Control, v. 32, p. 470-485.

Nealson, K.H. et J.W. Hastings. 1979. «Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance». Microbiol Rev, v. 43, no. 4, p. 496-518.

Nicas, T.I. et B.H. Iglewski. 1985. «The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*». Can J Microbiol, v. 31, no. 4, p. 387-392.

O'Malley, Y.Q., K.J. Reszka, G.T. Rasmussen, M.Y. Abdalla, G.M. Denning et B.E. Britigan. 2003. «The Pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells». Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 285, no. 5, p. L1077-1086.

O'Toole, G.A. et R. Kolter. 1998. «Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development». Mol Microbiol, v. 30, no. 2, p. 295-304.

O'Toole, G., H.B. Kaplan et R. Kolter. 2000. «Biofilm formation as microbial development». Annu Rev Microbiol, v. 54, p. 49-79.

Obritsch, M.D., D.N. Fish, R. MacLaren et R. Jung. 2005. «Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options». Pharmacotherapy, v. 25, no. 10, p. 1353-1364.

Ochsner, U.A., A. Fiechter et J. Reiser. 1994. «Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis». J Biol Chem, v. 269, no. 31, p. 19787-19795.

Park, S.Y., S.J. Lee, T.K. Oh, J.W. Oh, B.T. Koo, D.Y. Yum et J.K. Lee. 2003. «AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in Arthrobacter sp., and predicted homologues in other bacteria». Microbiology, v. 149, no. Pt 6, p. 1541-1550.

Parsek, M.R., D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan, Jr. et E.P. Greenberg. 1999. «Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, no. 8, p. 4360-4365.

Passador, L., K.D. Tucker, K.R. Guertin, M.P. Journet, A.S. Kende et B.H. Iglewski. 1996. «Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI». J Bacteriol, v. 178, no. 20, p. 5995-6000.

Pearson, J.P., K.M. Gray, L. Passador, K.D. Tucker, A. Eberhard, B.H. Iglewski et E.P. Greenberg. 1994. «Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 91, no. 1, p. 197-201.

Pearson, J.P., L. Passador, B.H. Iglewski et E.P. Greenberg. 1995. «A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, no. 5, p. 1490-1494.

Pearson, J.P., E.C. Pesci et B.H. Iglewski. 1997. «Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes». J Bacteriol, v. 179, no. 18, p. 5756-5767.

Pearson, J.P., C. Van Delden et B.H. Iglewski. 1999. «Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals». J Bacteriol, v. 181, no. 4, p. 1203-1210.

Pearson, J.P., M. Feldman, B.H. Iglewski et A. Prince. 2000. «*Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection». Infect Immun, v. 68, no. 7, p. 4331-4334.

Pechere, J.C. et I.R. Vladoianu. 1992. «Development of resistance during ceftazidime and cefepime therapy in a murine peritonitis model». J Antimicrob Chemother, v. 29, no. 5, p. 563-573.

Pedersen, M., H. Permin, K.S. Kristensen et S. Norn. 1992. «Microbial antigens and cytokines cause type I allergic reactions in AIDS patients. In vitro studies of basophil histamine release». Pneumonol Alergol Pol, v. 60 Suppl 2, p. 74-79.

Pesci, E.C., J.P. Pearson, P.C. Seed et B.H. Iglewski. 1997. «Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 179, no. 10, p. 3127-3132.

Pesci, E.C., J.B. Milbank, J.P. Pearson, S. McKnight, A.S. Kende, E.P. Greenberg et B.H. Iglewski. 1999. «Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, no. 20, p. 11229-11234.

Pessi, G., F. Williams, Z. Hindle, K. Heurlier, M.T. Holden, M. Camara, D. Haas et P. Williams. 2001. «The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 183, no. 22, p. 6676-6683.

Pier, G.B. 2002. «CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection». Curr Opin Microbiol, v. 5, no. 1, p. 81-86.

Pilewski, J.M. et R.A. Frizzell. 1999. «Role of CFTR in airway disease». Physiol Rev, v. 79, no. 1 Suppl, p. S215-255.

Pirhonen, M., D. Flego, R. Heikinheimo et E.T. Palva. 1993. «A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*». Embo J, v. 12, no. 6, p. 2467-2476.

Poole, K. 2001. «Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms». J Mol Microbiol Biotechnol, v. 3, no. 2, p. 255-264.

Prescott, L., J.P. Harley et D.A. Klein, 1995, Microbiologie: Bruxelles, W.C. Brown Publishers, 1013 p.

Pritchard, A.E. et M.L. Vasil. 1990. «Possible insertion sequences in a mosaic genome organization upstream of the exotoxin A gene in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 172, no. 4, p. 2020-2028.

Quinn, J.P., E.J. Dudek, C.A. DiVincenzo, D.A. Lucks et S.A. Lerner. 1986. «Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections». J Infect Dis, v. 154, no. 2, p. 289-294.

Rahme, L.G., E.J. Stevens, S.F. Wolfort, J. Shao, R.G. Tompkins et F.M. Ausubel. 1995. «Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals». Science, v. 268, no. 5219, p. 1899-1902.

Rahme, L.G., M.W. Tan, L. Le, S.M. Wong, R.G. Tompkins, S.B. Calderwood et F.M. Ausubel. 1997. «Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 94, no. 24, p. 13245-13250.

Rahme, L.G., F.M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B.C. Goumnerov, G.W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M.W. Tan, J. Tsongalis, C.L. Walendziewicz et R.G. Tompkins. 2000. «Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, no. 16, p. 8815-8821.

Rainger, G.E., A. Fisher, C. Shearman et G.B. Nash. 1995. «Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro». Am J Physiol, v. 269, no. 4 Pt 2, p. H1398-1406.

Rajan, S. et L. Saiman. 2002. «Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis». Semin Respir Infect, v. 17, no. 1, p. 47-56.

Ramphal, R., S.K. Arora et B.W. Ritchings. 1996. «Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*». Am J Respir Crit Care Med, v. 154, no. 4 Pt 2, p. S170-174.

Rashid, M.H., K. Rumbaugh, L. Passador, D.G. Davies, A.N. Hamood, B.H. Iglewski et A. Kornberg. 2000. «Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, no. 17, p. 9636-9641.

Rasmussen, T.B., T. Bjarnsholt, M.E. Skindersoe, M. Hentzer, P. Kristoffersen, M. Kote, J. Nielsen, L. Eberl et M. Givskov. 2005a. «Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector». J Bacteriol, v. 187, no. 5, p. 1799-1814.

Rasmussen, T.B., M.E. Skindersoe, T. Bjarnsholt, R.K. Phipps, K.B. Christensen, P.O. Jensen, J.B. Andersen, B. Koch, T.O. Larsen, M. Hentzer, L. Eberl, N. Hoiby et M. Givskov. 2005b. «Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by Penicillium species». Microbiology, v. 151, no. Pt 5, p. 1325-1340.

Ratledge, C. et L.G. Dover. 2000. «Iron metabolism in pathogenic bacteria». Annu Rev Microbiol, v. 54, p. 881-941

Read, R.C., P. Roberts, N. Munro, A. Rutman, A. Hastie, T. Shryock, R. Hall, W. McDonald-Gibson, V. Lund, G. Taylor et et al. 1992. «Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating». J Appl Physiol, v. 72, no. 6, p. 2271-2277.

Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski et D. Haas. 1997. «The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase». Mol Microbiol, v. 24, no. 2, p. 309-319.

Reimmann, C., N. Ginet, L. Michel, C. Keel, P. Michaux, V. Krishnapillai, M. Zala, K. Heurlier, K. Triandafillu, H. Harms, G. Defago et D. Haas. 2002. «Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1». Microbiology, v. 148, no. Pt 4, p. 923-932.

Richards, M.J., J.R. Edwards, D.H. Culver et R.P. Gaynes. 2000. «Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States». Infect Control Hosp Epidemiol, v. 21, no. 8, p. 510-515.

Ritter, C. et M. Luckner. 1971. «Biosynthesis of 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline derivates (pseudane) in *Pseudomonas aeruginosa*». Eur J Biochem, v. 18, no. 3, p. 391-400.

Rocchetta, H.L., L.L. Burrows et J.S. Lam. 1999. «Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*». Microbiol Mol Biol Rev, v. 63, no. 3, p. 523-553.

Rowen, D.W. et V. Deretic. 2000. «Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients». Mol Microbiol, v. 36, no. 2, p. 314-327.

Royt, P.W., R.V. Honeychuck, V. Ravich, P. Ponnaluri, L.K. Pannell, J.S. Buyer, V. Chandhoke, W.M. Stalick, L.C. DeSesso, S. Donohue, R. Ghei, J.D. Relyea et R. Ruiz. 2001. «4-hydroxy-2-nonylquinoline: a novel iron chelator isolated from a bacterial cell membrane». Bioorg Chem, v. 29, no. 6, p. 387-397.

Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold et A.N. Hamood. 1999a. «Contribution of the regulatory gene lasR to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection of burned mice». J Burn Care Rehabil, v. 20, no. 1 Pt 1, p. 42-49.

Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold et A.N. Hamood. 1999b. «*Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes». J Hosp Infect, v. 43, no. 3, p. 211-218.

Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold, B.H. Iglewski et A.N. Hamood. 1999. «Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections». Infect Immun, v. 67, no. 11, p. 5854-5862.

Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold et A.N. Hamood. 2000. «The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*». Microbes Infect, v. 2, no. 14, p. 1721-1731.

Sailer, F.C., B.M. Meberg et K.D. Young. 2003. «beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*». FEMS Microbiol Lett, v. 226, no. 2, p. 245-249.

Salyers, A. A. et D.D. Whitt, 2002, Bacterial pathogenesis : a molecular approach, 2ième édition. Washington, D.C., ASM Press, chapitre 16: p. 247-262.

Santé Canada. 2001. Fiche technique santé-sécurité-matières infectieuses. Agence de santé publique du Canada. Santé Canada.

Sauer, K., A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton et D.G. Davies. 2002. «*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm». J Bacteriol, v. 184, no. 4, p. 1140-1154.

Schaefer, A.L., B.L. Hanzelka, A. Eberhard et E.P. Greenberg. 1996. «Quorum sensing in Vibrio fischeri: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs». J Bacteriol, v. 178, no. 10, p. 2897-2901.

Scharfman, A., S.K. Arora, P. Delmotte, E. Van Brussel, J. Mazurier, R. Ramphal et P. Roussel. 2001. «Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*». Infect Immun, v. 69, no. 9, p. 5243-5248.

Schell, M.A. 1993. «Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators». Annu Rev Microbiol, v. 47, p. 597-626.

Schultz, D.R. et K.D. Miller. 1974. «Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors». Infect Immun, v. 10, no. 1, p. 128-135.

Schuster, M., C.P. Lostroh, T. Ogi et E.P. Greenberg. 2003. «Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis». J Bacteriol, v. 185, no. 7, p. 2066-2079.

Shahid, M. et A. Malik. 2005. «Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients». Indian J Med Res, v. 122, no. 4, p. 324-329.

Shapiro, J.A. 1998. «Thinking about bacterial populations as multicellular organisms». Annu Rev Microbiol, v. 52, p. 81-104.

Singh, P.K., A.L. Schaefer, M.R. Parsek, T.O. Moninger, M.J. Welsh et E.P. Greenberg. 2000. «Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms». Nature, v. 407, no. 6805, p. 762-764.

Smith, K.M., Y. Bu et H. Suga. 2003a. «Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs». Chem Biol, v. 10, no. 1, p. 81-89.

Smith, K.M., Y. Bu et H. Suga. 2003b. «Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer». Chem Biol, v. 10, no. 6, p. 563-571.

Smith, R.S., E.R. Fedyk, T.A. Springer, N. Mukaida, B.H. Iglewski et R.P. Phipps. 2001. «IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the Pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2». J Immunol, v. 167, no. 1, p. 366-374.

Smith, R.S., S.G. Harris, R. Phipps et B. Iglewski. 2002. «The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo». J Bacteriol, v. 184, no. 4, p. 1132-1139.

Smith, R.S. et B.H. Iglewski. 2003a. «*Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence». Curr Opin Microbiol, v. 6, no. 1, p. 56-60.

Smith, R.S. et B.H. Iglewski. 2003b. «*Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target». J Clin Invest, v. 112, no. 10, p. 1460-1465.

Stevens, A.M., K.M. Dolan et E.P. Greenberg. 1994. «Synergistic binding of the Vibrio fischeri LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 91, no. 26, p. 12619-12623.

Stevens, A.M. et E.P. Greenberg. 1997. «Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes». J Bacteriol, v. 179, no. 2, p. 557-562.

Stewart-Tull, D.E. et A.V. Armstrong. 1972. «The effect of 1-hydroxyphenazine and pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* on mammalian cell respiration». J Med Microbiol, v. 5, no. 1, p. 67-73.

Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory et M.V. Olson. 2000. «Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen». Nature, v. 406, no. 6799, p. 959-964.

Sureau, B., E. Arquie, F. Boyer et M. Saviard. 1948. «Premières données sur la production d'une "streptomycinase" par certaines souches microbiennes». Ann. Inst. Pasteur Paris, v. 75, p. 169-171.

Takase, H., H. Nitanai, K. Hoshino et T. Otani. 2000. «Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice». Infect Immun, v. 68, no. 4, p. 1834-1839.

Takeda, R. 1959. «Isolation of substance B from the culture of *Pseudomonas aeruginosa* T359». Hakko Koyaku Zasshi, v. 37, p. 59-63.

Tang, H.B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B.H. Iglewski, J.B. Goldberg et A. Prince. 1996. «Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection». Infect Immun, v. 64, no. 1, p. 37-43.

Tateda, K., R. Comte, J.C. Pechere, T. Kohler, K. Yamaguchi et C. Van Delden. 2001. «Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*». Antimicrob Agents Chemother, v. 45, no. 6, p. 1930-1933.

Taylor, G.W., Z.A. Machan, S. Mehmet, P.J. Cole et R. Wilson. 1995. «Rapid identification of 4-hydroxy-2-alkylquinolines produced by *Pseudomonas aeruginosa* using gas chromatography-electron-capture mass spectrometry». J Chromatogr B Biomed Appl, v. 664, no. 2, p. 458-462.

Telford, G., D. Wheeler, P. Williams, P.T. Tomkins, P. Appleby, H. Sewell, G.S. Stewart, B.W. Bycroft et D.I. Pritchard. 1998. «The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity». Infect Immun, v. 66, no. 1, p. 36-42.

Trautmann, M., P.M. Lepper et M. Haller. 2005. «Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism». Am J Infect Control, v. 33, no. 5 Suppl 1, p. S41-49.

Troillet, N., M.H. Samore et Y. Carmeli. 1997. «Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns». Clin Infect Dis, v. 25, no. 5, p. 1094-1098.

van Delden, C. et B.H. Iglewski. 1998. «Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections». Emerg Infect Dis, v. 4, no. 4, p. 551-560.

van Delden, C., R. Comte et A.M. Bally. 2001. «Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 183, no. 18, p. 5376-5384.

van Delden, C., 2004, Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, *in* J.-L. Ramos, ed., Pseudomonas, v. 2: New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, p. 553.

Vuong, C., S. Kocianova, J.M. Voyich, Y. Yao, E.R. Fischer, F.R. DeLeo et M. Otto. 2004. «A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence». J Biol Chem, v. 279, no. 52, p. 54881-54886.

Wade, D.S., M.W. Calfee, E.R. Rocha, E.A. Ling, E. Engstrom, J.P. Coleman et E.C. Pesci. 2005. «Regulation of Pseudomonas Quinolone Signal Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, v. 187, no. 13, p. 4372-4380.

Wagner, V.E., D. Bushnell, L. Passador, A.I. Brooks et B.H. Iglewski. 2003. «Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment». J Bacteriol, v. 185, no. 7, p. 2080-2095.

Wells, I.C. 1952. «Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*; syntheses of Pyo Ib, Pyo Ic, and Pyo III». J Biol Chem, v. 196, no. 1, p. 331-340.

Whiteley, M., K.M. Lee et E.P. Greenberg. 1999. «Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, no. 24, p. 13904-13909.

Wilkinson, S.G. 1968. «Studies on the cell walls of *Pseudomonas* species resistant to ethylenediaminetetra-acetic acid». J Gen Microbiol, v. 54, no. 2, p. 195-213.

Wilson, R., T. Pitt, G. Taylor, D. Watson, J. MacDermot, D. Sykes, D. Roberts et P. Cole. 1987. «Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro». J Clin Invest, v. 79, no. 1, p. 221-229.

Winslow, C.-E.A., J. Broadhurst, R.E. Buchanan, J. Krumwiede, C., L.A. Rogers et G.H. Smith. 1917. «The families and genera of the bacteria». J. Bacteriol., v. 2, p. 505-566.

Winson, M.K., M. Camara, A. Latifi, M. Foglino, S.R. Chhabra, M. Daykin, M. Bally, V. Chapon, G.P. Salmond, B.W. Bycroft et et al. 1995. «Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, no. 20, p. 9427-9431.

Winzer, K., C. Falconer, N.C. Garber, S.P. Diggle, M. Camara et P. Williams. 2000. «The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS». J Bacteriol, v. 182, no. 22, p. 6401-6411.

Wolfgang, M.C., B.R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C.G. Miyada et S. Lory. 2003. «Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*». Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, no. 14, p. 8484-8489.

Wu, H., Z. Song, M. Hentzer, J.B. Andersen, A. Heydorn, K. Mathee, C. Moser, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby et M. Givskov. 2000. «Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*». Microbiology, v. 146 (Pt 10), p. 2481-2493.

Wu, H., Z. Song, M. Givskov, G. Doring, D. Worlitzsch, K. Mathee, J. Rygaard et N. Hoiby. 2001. «*Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection». Microbiology, v. 147, no. Pt 5, p. 1105-1113.

Wu, H., Z. Song, M. Hentzer, J.B. Andersen, S. Molin, M. Givskov et N. Hoiby. 2004. «Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice». J Antimicrob Chemother, v. 53, no. 6, p. 1054-1061.

Xiao, G., É. Déziel, J. He, F. Lépine, B. Lesic, M.-H. Castonguay, S. Milot, P. Tampakaki, S.E. Stachel et L.G. Rahme. 2006. «MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands». Molecular Microbiology.

Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C.

Boucher et D.J. Hassett. 2002. «*Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis». Dev Cell, v. 3, no. 4, p. 593-603.

Zaidi, T.S., S.M. Fleiszig, M.J. Preston, J.B. Goldberg et G.B. Pier. 1996. «Lipopolysaccharide outer core is a ligand for corneal cell binding and ingestion of *Pseudomonas aeruginosa*». Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 37, no. 6, p. 976-986.

Zanetti, G., F. Bally, G. Greub, J. Garbino, T. Kinge, D. Lew, J.A. Romand, J. Bille, D. Aymon, L. Stratchounski, L. Krawczyk, E. Rubinstein, M.D. Schaller, R. Chiolero, M.P. Glauser et A. Cometta. 2003. «Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study». Antimicrob Agents Chemother, v. 47, no. 11, p. 3442-3447.