



**HAL**  
open science

# Étude de la composition et de l'assemblage du pore de translocation du système de secretion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*

Julien Goure

► **To cite this version:**

Julien Goure. Étude de la composition et de l'assemblage du pore de translocation du système de secretion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00008605

**HAL Id: tel-00008605**

**<https://theses.hal.science/tel-00008605>**

Submitted on 1 Mar 2005

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

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

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**  
**SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

**THESE**

présentée et soutenue publiquement par

**Julien GOURÉ**

Le 9 février 2005

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 25 avril 2002)

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

-----  
**ETUDE DE LA COMPOSITION ET DE L'ASSEMBLAGE**  
**DU PORE DE TRANSLOCATION DU SYSTEME DE SECRETION**  
**DE TYPE III CHEZ *Pseudomonas aeruginosa***  
-----

**Composition du jury :**

M. Dominique SCHNEIDER	<i>Professeur</i>	Président
M. Guy CORNELIS	<i>Professeur</i>	Rapporteur
M. Alain FILLOUX	<i>Directeur de recherche</i>	Rapporteur
M. Patrice BOQUET	<i>Professeur</i>	Examineur
M. Michel SATRE	<i>Directeur de recherche</i>	Examineur
Mme Ina ATTREE-DELIC	<i>Ingénieur d'étude (HDR)</i>	Directrice de thèse

*Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés,  
UMR 5092 CEA-CNRS-UJF  
Département de Réponse et Dynamique Cellulaire-CEA-Grenoble*



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**  
**SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

**THESE**

présentée et soutenue publiquement par

**Julien GOURÉ**

Le 9 février 2005

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 25 avril 2002)

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

-----

**ETUDE DE LA COMPOSITION ET DE L'ASSEMBLAGE**  
**DU PORE DE TRANSLOCATION DU SYSTEME DE SECRETION**  
**DE TYPE III CHEZ *Pseudomonas aeruginosa***

-----

**Composition du jury :**

M. Dominique SCHNEIDER	<i>Professeur</i>	Président
M. Guy CORNELIS	<i>Professeur</i>	Rapporteur
M. Alain FILLOUX	<i>Directeur de recherche</i>	Rapporteur
M. Patrice BOQUET	<i>Professeur</i>	Examineur
M. Michel SATRE	<i>Directeur de recherche</i>	Examineur
Mme Ina ATTREE-DELIC	<i>Ingénieur d'étude (HDR)</i>	Directrice de thèse

*Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés,  
UMR 5092 CEA-CNRS-UJF  
Département de Réponse et Dynamique Cellulaire-CEA-Grenoble*





*À mes parents,  
à Marie,  
à mon frère Éric*



Mes premiers remerciements vont à Ina Attrée, ma directrice de thèse, pour toutes les connaissances et le savoir faire qu'elle m'a transmis, pour toutes les discussions que nous avons eues, et pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier Monsieur Michel Satre pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier Monsieur le professeur Dominique Schneider pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Guy Cornelis, Alain Filloux et Patrice Boquet pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également Guy Brochier pour sa disponibilité et le travail mené en microscopie électronique.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe « *Pseudomonas aeruginosa* » ☐ Jacqueline Chabert, Sylvie Elsen, Eric Faudry et Alexandrine Pastor, pour leurs nombreux conseils, leur soutien et les moments que nous avons partagés.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire BBSI et plus particulièrement Ophélie, pour sa bonne humeur, Manu, pour sa sagesse et son soutien.



# TABLE DES MATIÈRES

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

<b>1. Le pathogène opportuniste <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	1
<b>1.A- Les infections à <i>P. aeruginosa</i></b>	2
<b>1.B- La mucoviscidose, un environnement favorable aux infections à <i>P. aeruginosa</i></b>	3
1.B.1. La mucoviscidose	3
1.B.2- Prédilection des patients CF aux infections à <i>P. aeruginosa</i>	4
1.B.2.1- Altération de la réponse immunitaire innée dans les poumons CF	5
1.B.2.2- Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> aux cellules épithéliales CF	6
1.B.2.3- Émergence du phénotype mucoïde de <i>P. aeruginosa</i>	7
1.B.2.4- Croissance sous forme de biofilm	7
<b>1.C- Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i></b>	8
1.C.1- Facteurs impliqués dans l'adhésion et la motilité de <i>P. aeruginosa</i>	10
1.C.1.1- Le flagelle	10
1.C.1.2- Les pili de type IV	11
1.C.1.3- Facteur d'attachement de type <i>fimbriae</i> (ou Cup)	12
1.C.1.4- Le lipopolysaccharide (LPS)	12
1.C.2- Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte	13
1.C.2.1- L'exotoxine A	13
1.C.2.2- L'élastase	14
1.C.2.3- Les phospholipases C	14
1.C.2.4- Les rhamnolipides	15
1.C.3- Régulation de l'expression de ces facteurs de virulence	16
1.C.3.1- Les systèmes de régulation à deux composants	16
1.C.3.2- Le quorum-sensing	17
<b>2- Les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif</b>	19
<b>2.A- Le système de sécrétion de type I</b>	20
<b>2.B- Le système de sécrétion de type II (ou sécrétion Sec-dépendante)</b>	20
<b>2.C- Le système de sécrétion de type IV</b>	22
<b>2.D- Le système de sécrétion de type V</b>	23
<b>2.E- Le système de sécrétion de type III (SSTT)</b>	23
2.E.1- Diversité et origine du SSTT	25
2.E.1.1- Diversité du SSTT	25
2.E.1.2- Origine du SSTT	26
2.E.2- L'appareil de sécrétion de type III	28
2.E.3- Les protéines chaperonnes du SSTT	31
2.E.4 - Les protéines effectrices du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	33
2.E.4.1- L'exoenzyme S	34
2.E.4.2- L'exoenzyme T	35
2.E.4.3- L'exoenzyme U	35
2.E.4.4- L'exoenzyme Y	36
2.E.5- La régulation du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	36
<b>3. Le translocon de <i>P. aeruginosa</i></b>	40
<b>3.A- L'opéron de translocation</b>	40
3.A.1- La protéine PcrG	41
3.A.2- La protéine PcrH	43
3.A.3- La protéine PcrV	44
3.A.3.1- PcrV et son homologue LcrV	44

3.A.3.2- PcrV, un candidat pour la vaccination	46
3.A.4- Les protéines translocatrices : PopB et PopD	47
3.A.4.1- La protéine PopB	47
3.A.4.2- La protéine PopD	48
<b>3.B- Homologues des protéines translocatrices dans les autres SSTT</b>	49
<b>Les objectifs du travail de thèse</b>	51

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

### 1- Bactéries et plasmides

<b>1.A- Répertoire des bactéries et plasmides utilisés</b>	53
<b>1.B- Cultures bactériennes</b>	55
1.B.1- Culture d' <i>Escherichia coli</i>	55
1.B.2- Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
1.B.3- Utilisation d'antibiotiques	55
1.B.4- Mesure de la croissance bactérienne	56
1.B.5- Conservation des souches	56
<b>1.C- Induction <i>in vitro</i> du SSTT</b>	56

### 2- Techniques de biologie moléculaire

<b>2.A- Méthodes usuelles</b>	57
2.A.1- Dosages des acides nucléiques	57
2.A.2- Précipitation des acides nucléiques à l'éthanol	57
2.A.3- Préparation d'acides nucléiques	57
2.A.3.1- Synthèse d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	57
2.A.3.2- Préparation d'ADN chromosomique de <i>P. aeruginosa</i>	58
2.A.3.3- Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	59
<b>2.B- Electrophorèse d'ADN</b>	59
2.B.1- Gel d'agarose	59
2.B.2- Gel d'acrylamide	60
<b>2.C- Récupération de fragments d'ADN</b>	60
2.C.1- Digestion enzymatique de l'ADN	60
2.C.2 - Récupération de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose	60
2.C.3- Récupération de fragment d'ADN à partir d'un gel d'acrylamide	61
<b>2.D- Clonage</b>	61
2.D.1- Déphosphorylation d'ADN double brin	61
2.D.2- Génération d'extrémités franches par l'ADN polymérase I de Klenow	61
2.D.3- Ligation	61
2.D.4- Transformation	62
2.D.4.1- Transformation d' <i>E. coli</i>	62
2.D.4.2- Transformation de <i>P. aeruginosa</i>	62
<b>2.E- Marquage non radioactif de fragments d'ADN par la méthode de « Random priming » et détection des sondes marquées</b>	63
2.E.1- Marquage non radioactif à la digoxygénine	63
2.E.2- Détection des fragments marqués à la digoxygénine	64
<b>2.F- Hybridation</b>	
2.F.1- Transfert de colonies sur membrane de nylon Hybond-N	64
2.F.2- Transfert de fragment d'ADN sur membrane de nylon Hybond-N	65
2.F.3- Hybridation ADN-ADN	65

### 3- Mutagénèse des gènes *pcrV*, *popB* et *popD* de *P. aeruginosa*

<b>3.A- La conjugaison triparentale</b>	66
<b>3.B- Sélection des doubles recombinants</b>	67
<b>3.C- Construction du mutant CHA<math>\Delta</math><i>popBpopD</i></b>	67

<b>3.D- Construction des mutants CHA<math>\Delta</math>pcrV et PAO1<math>\Delta</math>pcrV</b>	68
<b>3.E- Constructions des plasmides de complémentations</b>	69
<b>4-Techniques de biochimie</b>	
<b>4.A- Techniques usuelles</b>	70
4.A.1- Dosage des protéines	70
4.A.2- Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	70
4.A.3- Analyse des protéines par Western-blot	71
4.A.3.1- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	71
4.A.3.2- Immunodétection	72
<b>4.B- Surproduction et purification de protéines fusionnées à une queue polyhistidine</b>	73
4.B.1- Surproduction des protéines de fusion dans <i>E. coli</i>	73
4.B.2- Purification par IMAC	73
<b>4.C- Purification d'anticorps polyclonaux</b>	74
<b>4.D- Isolement des membranes de globules rouges sur gradient de saccharose par flottaison</b>	75
<b>5- Techniques de biologie cellulaire</b>	
<b>5.A- Conditions de culture</b>	77
<b>5.B- Modèles d'infection <i>P. aeruginosa</i> / cellules</b>	77
5.B.1- Préparation de <i>P. aeruginosa</i> pour les infections cellulaires	77
5.B.2- Test de cytotoxicité envers les macrophages	78
5.B.3- Test d'hémolyse	78
5.B.4- Expérience d'immunoprotection des GRM	79
<b>6- Techniques de microscopie électronique</b>	79

## **CHAPITRE III : ACTIVITE FORMATRICE DE PORES DU SSTT**

<b>1- Introduction</b>	81
<b>2- Mise en place du test hémolytique</b>	81
<b>3- Rôle des protéines PopB et PopD dans l'activité hémolytique</b>	84
3.A- Caractérisation des souches isogéniques $\Delta$ PopB et $\Delta$ PopD	84
3.B- PopB et PopD sont essentielles à l'activité formatrice de pores	87
<b>4- Rôle de PcrV dans l'hémolyse</b>	89
4.A- Caractérisation de la souche isogénique $\Delta$ PcrV	89
4.B- L'activité formatrice de pores requiert PcrV	90
<b>5- Discussion</b>	94

## **CHAPITRE IV : ASSEMBLAGE DU PORE DE TRANSLOCATION**

<b>1- Introduction</b>	103
<b>2- Insertion des protéines translocatrices PopB et PopD dans les membranes d'hématies</b>	103
<b>3- Rôle de PcrV dans l'assemblage de pores de translocation fonctionnels dans les membranes de GRM</b>	108
<b>4- Visualisation du pore de translocation</b>	110
<b>5- Discussion</b>	112



## **CHAPITRE V : IMMUNOPROTECTION**

<b>1- Introduction</b>	121
<b>2- Les anticorps anti-PcrV protègent les GRM de l'hémolyse SSTT-dépendante de <i>P. aeruginosa</i></b>	121
<b>3- Anticorps protecteurs anti-PcrV inhibent l'assemblage du pore de translocation</b>	126
<b>4- LcrV, protéine d'assemblage du pore de translocation YopB/D</b>	128
<b>5- Inhibition de l'assemblage du pore de translocation YopB/D de <i>Y. enterocolitica</i> par les anticorps anti-LcrV</b>	132
<b>6- Discussion</b>	134

## **CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

<b>1- Protéines essentielles à la formation du translocon</b>	141
<b>2- Etude de la composition des translocons de <i>P. aeruginosa</i> et de <i>Yersinia</i> spp. dans les membranes des cellules hôtes</b>	142
<b>3- L'antigène V: organisateur structural du translocon</b>	142
<b>4- Un mécanisme d'assemblage du translocon du SSTT commun à toutes les espèces bactériennes ?</b>	145
<b>5- Comment se réalise la translocation des protéines : existence d'une translocase ?</b>	146
<b>6- Le translocon : une cible thérapeutique de choix ?</b>	147

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	149
------------------------------------	-----

## **ANNEXES**

<b>Annexe 1</b>	175
<b>Annexe 2</b>	177
<b>Annexe 3</b>	179

# INDEX DES ILLUSTRATIONS

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

<b>Figure I.1.</b> Représentation circulaire du génome de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	2
<b>Figure I.2.</b> Représentation schématique de la différence de clairance mucociliaire	5
<b>Figure I.3.</b> Modèle de formation d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	8
<b>Figure I.4.</b> Interactions entre les différents facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> et son hôte	9
<b>Figure I.5.</b> Mécanisme moléculaire du quorum-sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	18
<b>Figure I.6.</b> Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion trouvés dans les bactéries à Gram négatif	19
<b>Figure I.7.</b> Modèle de la voie de sécrétion de type II chez <i>P. aeruginosa</i>	22
<b>Figure I.8.</b> Comparaison entre les arbres phylogénétiques réalisés avec les séquences des protéines de la famille de YscV des différents SSTT et les séquences d'ARNr 16S	26
<b>Figure I.9.</b> Diagrammes comparant la position des différents composants flagellaires connus avec celle de leurs homologues fonctionnels connus ou hypothétiques du SSTT	27
<b>Tableau I.1.</b> Famille des protéines de l'injectisome du SSTT très conservées entre les différentes espèces bactériennes	29
<b>Figure I.10.</b> Représentation modélisée du système de sécrétion de type III	30
<b>Figure I.11.</b> Représentation schématique du modèle de régulation du SSTT de <i>P. aeruginosa</i>	37
<b>Figure I.12.</b> Représentation schématique des opérons de translocation de <i>Yersinia</i> ( <i>lcrGVHypopBD</i> ) et de <i>P. aeruginosa</i> ( <i>pcrGVHpopBD</i> )	41
<b>Figure I.13.</b> Modèle de régulation de la sécrétion de type III chez <i>Y. pestis</i> par titration de LcrG	42
<b>Figure I.14.</b> Structure tertiaire de LcrV de <i>Y. pestis</i>	45
<b>Figure I.15.</b> Organisation structurale des protéines homologues de PopB et de PopD dans les différents SSTT bactériens	50

## CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>Tableau II.1.</b> Souches bactériennes et plasmides utilisés	53
<b>Tableau II.2.</b> Oligonucléotides utilisés au cours de ces travaux	58
<b>Tableau II.3.</b> Composition des différents gels d'acrylamide utilisés	71
<b>Tableau II.4.</b> Nature et dilution des anticorps utilisés en Western-blot	72

## CHAPITRE III : ACTIVITE FORMATRICE DE PORES DU SSTT

<b>Figure III.1.</b> Caractérisation de l'activité hémolytique type III et contact-dépendante induite par <i>P. aeruginosa</i>	82
<b>Figure III.2.</b> Caractérisation de la taille des pores induits par l'activité formatrice de pores type III-dépendante de <i>P. aeruginosa</i>	83
<b>Figure III.3.</b> Vérification de la mutation des gènes <i>popB</i> et <i>popD</i>	85
<b>Figure III.4.</b> Analyse par Western blot des protéines sécrétées dans le surnageant de culture de CHA et CHA $\Delta$ <i>popBD</i> , en condition non inductrice et inductrice	86
<b>Figure III.5.</b> Vérification des complémentations de CHA $\Delta$ <i>popBD</i>	87
<b>Figure III.6.</b> Activité hémolytique et cytotoxique	88
<b>Figure III.7.</b> Criblage du mutant CHA $\Delta$ <i>pcrV</i> par Western blot	89
<b>Figure III.8.</b> Étude de la sécrétion et de la régulation du SSTT dans le mutant <i>PcrV</i>	91
<b>Figure III.9.</b> Le mutant CHA $\Delta$ V est incapable de former des pores SSTT-dépendants	92
<b>Figure III.10.</b> L'activité formatrice de pores requiert une origine bactérienne commune de <i>PcrV</i> , <i>PopB</i> et <i>PopD</i>	93
<b>Figure III.11.</b> Comparaison des profils de sécrétion de PAO1 et de PAO1 $\Delta$ <i>pcrV</i>	97

<b>Figure III.12.</b> Alignement des séquences protéiques de PopB de <i>P. aeruginosa</i> et de YopB de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	99
<b>Figure III.13.</b> Alignement des séquences protéiques de PopD de <i>P. aeruginosa</i> et de YopD de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	100

## CHAPITRE IV : ASSEMBLAGE DU PORE DE TRANSLOCATION

<b>Figure IV.1.</b> Insertion des protéines PopB et PopD dans les membranes d'hématies infectées par CHA	104
<b>Figure IV.2.</b> Comparaison de l'affinité des anticorps anti-PopB, anti-PopD et anti-PcrV	106
<b>Figure IV.3.</b> Isolement des membranes de GRM infectées par les mutants $\Delta B$ et $\Delta D$	107
<b>Figure IV.4.</b> Accumulation de PopB dans la fraction insoluble au TX-100	108
<b>Figure IV.5.</b> Insertion de PopD dans les membranes de GRM requiert PcrV	109
<b>Figure IV.6.</b> Images du pore de translocation du SSTT de <i>P. aeruginosa</i> par microscopie électronique dans les membranes de GRM infectés par CHA	111
<b>Figure IV.7.</b> Alignement des séquences protéiques des trois homologues de PcrV	113
<b>Figure IV.8.</b> Modèle du mécanisme de formation du pore de translocation de <i>P. aeruginosa</i>	116
<b>Figure IV.9.</b> Analyse par microscopie électronique en coloration négative des structures en forme d'anneau formées par PopB induisant la lyse des liposomes	119

## CHAPITRE V : IMMUNOPROTECTION

<b>Figure V.1.</b> Anticorps anti-PcrV protègent les GRM de l'hémolyse type III-dépendante de <i>P. aeruginosa</i>	122
<b>Figure V.2.</b> Effet dose dépendant de la protection conférée par les anticorps protecteurs	124
<b>Figure V.3.</b> Titration des anticorps protecteurs anti-PcrV par les protéines recombinantes PcrV et LcrV	126
<b>Figure V.4.</b> Assemblage des pores de translocation PopB/D en présence des anticorps protecteurs anti-PcrV	127
<b>Figure V.5.</b> Activité hémolytique SSTT-dépendante de <i>Y. enterocolitica</i>	129
<b>Figure V.6.</b> Insertion des protéines YopB et YopD dans les membranes d'hématies infectées par <i>Y. enterocolitica</i>	131
<b>Figure V.7.</b> Effet dose dépendant des anticorps protecteurs anti-LcrV sur la protection conférée par les anticorps protecteurs	132
<b>Figure V.8.</b> Effet des anticorps anti-LcrV sur l'assemblage du pore de translocation YopB/D du SSTT de <i>Y. enterocolitica</i>	133
<b>Figure V.9.</b> Alignement des séquences protéiques de PcrV de <i>P. aeruginosa</i> et de LcrV de <i>Y. pestis</i>	138
<b>Figure V.10.</b> Structure primaire, secondaire et tertiaire de l'épitope protecteur de LcrV de <i>Y. pestis</i>	139

## CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

<b>Figure VI.1.</b> Modèle d'assemblage du pore de translocation PopB/D de <i>P. aeruginosa</i>	143
---	-----

## PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

<b>α-</b>	anti-
<b>ADN</b> ☐	Acide désoxyribonucléique
<b>Ac</b> ☐	Anticorps
<b>Ap</b>	Ampicilline
<b>BrEt</b> ☐	Bromure d'éthidium
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
<b>Cb</b>	Carbenicilline
<b>DIG</b>	Digoxygénine
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EGTA</b> ☐	Acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthyléther)-N, N, N', N'- tétraacétique
<b>Gm</b>	Gentamycine
<b>GRM</b>	Globules Rouges de Mouton
<b>GTE</b>	Glucose, Tris-HCl, EDTA
<b>Km</b>	Kanamycine
<b>Kb</b>	kilobase
<b>KDa</b>	kiloDalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>MOI</b>	Multiplicité d'infection
<b>NBT</b>	Nitro Bleu de Tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>pb</b> ☐	Paire de base
<b>pC</b> ☐	Promoteur du gène <i>exsC</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PIA</b>	<i>Pseudomonas</i> Isolation Agar
<b>PEG</b> ☐	Poly éthylène glycol
<b>Pop</b> ☐	<i>Pseudomonas</i> outer proteins
<b>qsp</b>	Quantité suffisante pour
<b>RBS</b> ☐	Ribosome Binding Site
<b>RNase A</b>	Ribonucléase A
<b>Rpm</b>	Rotations par minute
<b>SDS</b>	Dodécyl Sulfate de Sodium
<b>SSTT</b> ☐	Système de Sécrétion de Type III
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TBE</b>	Tampon Tris-Borate-EDTA
<b>TE</b>	Tampon Tris-EDTA
<b>Tc</b>	Tétracycline
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetraméthyl-éthylènediamine
<b>Tris</b> ☐	Tris-(hydrométhyl)aminométhane
<b>U</b> ☐	Unité
<b>X-phosphate</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
<b>X<sup>r</sup></b>	Résistance à un antibiotique
<b>Yop</b> ☐	<i>Yersinia</i> outer proteins



**CHAPITRE I**  
**INTRODUCTION**



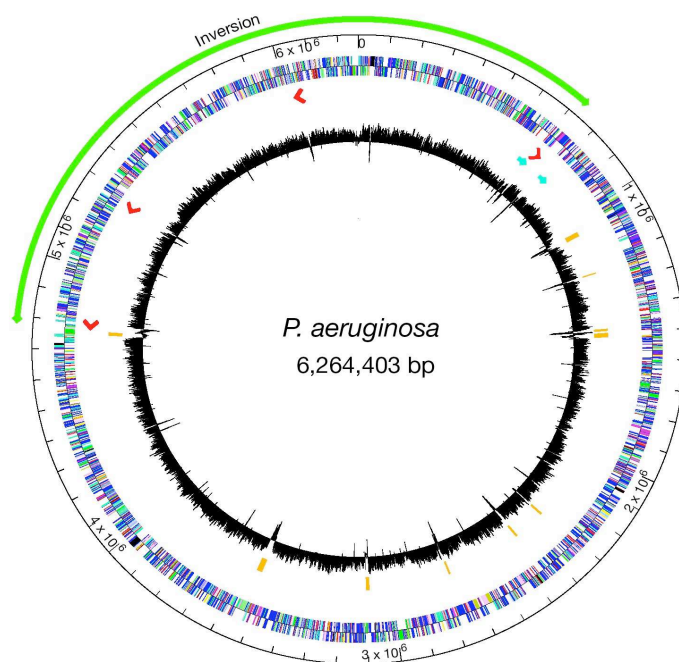
## 1. Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *P. aeruginosa*, anciennement appelé bacille pyocyanique, est un bacille à Gram négatif qui se développe dans un large spectre de températures comprises entre +4°C et +41°C. Elle possède plusieurs appendices de mobilité lui permettant de se déplacer dans son environnement. Elle est chimio-organotrophe et possède un métabolisme oxydatif mais elle n'est pas pour autant caractérisée comme une bactérie aérobie stricte. En effet, *P. aeruginosa* peut se développer en absence d'oxygène en utilisant les nitrates comme accepteurs d'électrons pour la respiration anaérobie. Cette bactérie vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau, le sol humide ou sur les végétaux. Elle peut également vivre à l'état de commensale sur la peau et dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux.

En 2000, le génome de la souche de référence, PAO1, a été entièrement séquencé (figure I.1) et ce dernier est disponible sur internet au <http://www.pseudomonas.com> (Stover *et al.*, 2000). Ce génome d'environ 6,3 Mb et 5 570 cadres de lecture prédits est de taille importante par rapport au génome d'*Escherichia coli* (4,6 Mb) (Blattner *et al.*, 1997). La majorité des cadres de lecture prédits ont un contenu en base guanine et cytosine (G+C %) très élevé (66,6 %), comme l'ensemble du génome. En outre, le génome de *P. aeruginosa* varie en taille selon les clones étudiés entre 5 et 7 Mb. Il est constitué d'une mosaïque de loci d'ADN spécifiques d'une part à l'espèce (70 à 90 %) et d'autre part au clone (10 à 30 %) (Romling *et al.*, 1997).

*P. aeruginosa* est capable d'infecter un large spectre d'hôtes: humain, souris, plantes, insectes, nématodes et amibes (D'Argenio *et al.*, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Pukatzki *et al.*, 2002; Rahme *et al.*, 1995). Le même arsenal de facteurs de virulence est utilisé pour coloniser l'ensemble de ces hôtes (Rahme *et al.*, 1995).





**Figure 1.1.** Représentation circulaire du génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

Le cercle gradué le plus à l'extérieur indique l'emplacement chromosomique en paire de base, l'espace entre chaque graduation représente 100 kb. La répartition des gènes est représentée sous formes de barres de différentes couleurs selon la catégorie fonctionnelle de ces gènes. Ce code de couleur est disponible à l'adresse <http://www.pseudomonas.com>. Les flèches rouges indiquent l'emplacement et la direction de transcription des gènes codant pour les ARN ribosomiques. La flèche verte représente la région inversée suite à un événement de recombinaison homologue entre *rrnA* et *rrnB*. Les barres jaunes correspondent à des régions  $\geq 3$  kb contenant un G+C% inférieur à 58,8%.

## 1.A- Les infections à *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste. Elle est donc peu virulente chez les sujets immunocompétents mais elle est capable d'infecter les individus dont les défenses immunitaires sont déprimées. Dans de nombreux cas, l'altération des défenses immunitaires favorise des infections poly-microbiennes. Cependant *P. aeruginosa* est très souvent retrouvée comme la bactérie majoritaire au sein de ces infections. Les principaux facteurs de risque d'infection à *P. aeruginosa* sont les traumatismes divers (brûlures, fractures ouvertes, interventions chirurgicales), les chimiothérapies neutropéniantes, le diabète et les âges extrêmes de la vie. De plus, les nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques

acquis et/ou développés par *P. aeruginosa*, associés à son exceptionnelle capacité d'adaptation aux nouveaux environnements créés par les activités humaines, comme les siphons et les canalisations des hôpitaux, font de cette bactérie l'un des plus redoutables agents responsables d'infections nosocomiales.

Ainsi, *P. aeruginosa* peut être retrouvée dans des infections cutanées dont les atteintes les plus graves concernent les grands brûlés. En effet, l'altération de la barrière physique que constitue la peau, ainsi que la diminution locale de la réponse immune humorale entraînent une colonisation rapide de la peau par *P. aeruginosa*, pouvant conduire à des septicémies responsables d'une mortalité élevée (Deitch *et al.*, 1985). Cette bactérie est également responsable d'infections ophtalmologiques, urinaires, ORL, ostéo-articulaires, neuro-méningées et digestives.

Enfin, *P. aeruginosa* est responsable d'infections broncho-pulmonaires graves, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces derniers, l'apparition de ce germe dans le tractus respiratoire constitue une étape importante dans l'évolution de la maladie (Aebi *et al.*, 1995).

## **1.B- La mucoviscidose, un environnement favorable aux infections à *P. aeruginosa***

### **1.B.1 La mucoviscidose**

La mucoviscidose (CF pour la dénomination anglo-saxonne de Cystic Fibrosis) est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive. En Europe, c'est la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne avec une incidence d'environ 1 naissance sur 2 500 (Bye *et al.*, 1994). En France, elle touche 5 000 à 6 000 personnes et l'on compte environ 300 nouveaux cas par an. Cette maladie génétique affecte le gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), impliquée dans le transport des ions chlorures (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989).

Depuis l'identification du gène *cftr*, plus de 1 000 mutations affectant ce gène ont été identifiées (Goldberg et Pier, 2000; Ratjen et Doring, 2003; Zielenski, 2000). Parmi celles-ci, la mutation  $\Delta F508$ , qui est une délétion du codon CTT (phénylalanine) en position 508, est la plus fréquente. En effet, l'allèle  $\Delta F508$  représente 70 % de tous les allèles mutants du CFTR.

Ces différentes mutations ont généralement pour conséquence soit une absence totale de la protéine, soit l'expression d'une protéine CFTR non fonctionnelle. Le CFTR étant exprimé dans les cellules épithéliales de nombreux tissus, les symptômes de la mucoviscidose sont donc multiples et variés. Le dysfonctionnement de cette protéine entraîne en particulier une imperméabilité des membranes cellulaires aux ions chlorures. De ce fait, l'eau qui suit le mouvement des ions ne sort pas des cellules, ce qui provoque une mauvaise hydratation des sécrétions, notamment du mucus bronchique.

Les conséquences d'un mucus bronchique déshydraté et visqueux sont doubles (Ratjen et Doring, 2003). Elles sont d'une part d'ordre mécanique: l'obstruction canaliculaire ou luminale évolue vers différentes fibroses qui contribuent à l'évolutivité et au caractère irréversible des lésions. D'autre part, ces sécrétions épaisses constituent un terrain propice aux surinfections bactériennes.

Au stade précoce de la maladie, les germes pathogènes les plus souvent retrouvés dans les voies respiratoires sont *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Ensuite, vers l'âge de 8-10 ans, environ 80 % des patients sont infectés par un seul germe *P. aeruginosa* (Aebi *et al.*, 1995) et ceci de façon définitive. La colonisation de l'arbre respiratoire par *P. aeruginosa* est un tournant dans la maladie car elle est associée à une détérioration progressive du tissu pulmonaire, ce qui conduit par conséquent à une insuffisance respiratoire chronique. Cette modification de la colonisation des bronches serait due à l'altération de l'épithélium respiratoire par les infections à *S. aureus* et *H. influenzae*. Ceci entraîne une augmentation de l'adhérence de *P. aeruginosa* sur la surface de cet épithélium (Lyczak *et al.*, 2002).

Les patients atteints de mucoviscidose présentent une prédisposition incontestable aux infections à *P. aeruginosa*. En effet, la plupart des études (Cystic Fibrosis Foundation) révèlent qu'environ 75 % des décès de patients CF sont causés par une infection chronique à *P. aeruginosa*.

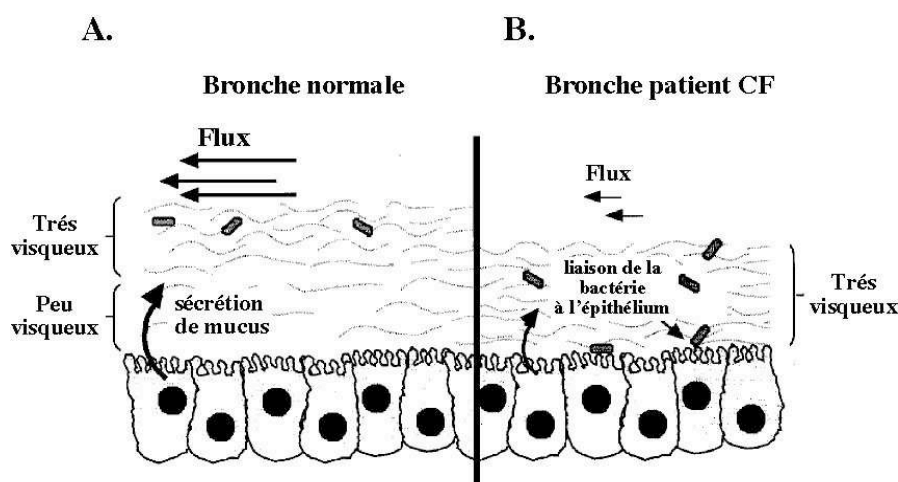
### **1.B.2- Prédisposition des patients CF aux infections à *P. aeruginosa***

L'hypersensibilité des patients CF aux infections pulmonaires à *P. aeruginosa* est multifactorielle, associant à la fois des facteurs de l'hôte et des facteurs bactériens. Ces différents facteurs sont probablement plus complémentaires qu'exclusifs.

### 1.B.2.1- Altération de la réponse immunité innée dans les poumons CF

La première ligne de défense de l'hôte rencontrée par les bactéries au niveau pulmonaire est l'immunité innée. Au niveau du tractus respiratoire, l'immunité innée est composée de cellules phagocytaires (neutrophiles polymorphonucléaires appelés PMNs et macrophages alvéolaires), lesquelles sont impliquées dans le processus inflammatoire. Elle fait également intervenir deux autres principaux mécanismes de défense: la clairance mucociliaire et l'activité antimicrobienne du liquide de surface pulmonaire.

La clairance mucociliaire repose sur deux phénomènes anatomiques i) la présence de mucus en bordure de la lumière des voies respiratoires et ii) la présence de cils à la surface apicale de l'épithélium respiratoire. La couche de mucus est biphasique. Elle est constituée d'une couche supérieure visqueuse piégeant les particules et les micro-organismes, et d'une couche inférieure plus fluide dans laquelle battent les cils (Figure I.2A). Les cils respiratoires battent de façon synchrone créant ainsi un courant continu qui permet d'éliminer la couche supérieure de mucus vers le naso-pharynx où les sécrétions sont expectorées ou dégluties (Figure I.2A). Chez le patient CF, la viscosité élevée du fluide respiratoire inhibe le battement des cils et donc l'élimination des micro-organismes (Figure I.2B). Par conséquent, *P. aeruginosa* persiste dans les bronches de ces patients et adhère à l'épithélium respiratoire (Lyczak *et al.*, 2002; Roger *et al.*, 1999; Wills *et al.*, 1997).



**Figure I.2. Représentation schématique de la différence de clairance mucociliaire** (Lyczak *et al.*, 2002).

**A.** dans des bronches saines et **B.** dans les bronches de patients mucoviscidiques.

La forte activité antimicrobienne du liquide de surface pulmonaire repose sur l'action de peptides antimicrobiens ( $\beta$ -défensine de type 1), du lysozyme et de la lactoferrine (Goldman *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996). Dans le cas de patients CF, la modification de la composition ionique du liquide de surface pulmonaire (concentration élevée d'ions chlorures) inhibe l'activité antimicrobienne de ce liquide, favorisant ainsi la colonisation bactérienne (Gilljam *et al.*, 1989; Goldman *et al.*, 1997; Joris *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996). Cette modification de la composition ionique du liquide de surface pulmonaire affecte également les PMNs qui présentent, dans ces conditions, des défauts de phagocytose ainsi qu'un taux d'apoptose plus élevé (Tager *et al.*, 1998).

### 1.B.2.2- Adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales CF

L'adhérence des bactéries à la muqueuse respiratoire est considérée comme le mécanisme initial et déterminant dans la colonisation de l'arbre respiratoire. Ce mécanisme implique d'une part, des récepteurs présents au niveau de la muqueuse respiratoire de l'hôte et d'autre part, des adhésines bactériennes.

Des études histologiques ont montré que l'importance des lésions du tissu pulmonaire observée chez les patients CF (Plotkowski *et al.*, 1991) était associée à une augmentation de l'adhérence de *P. aeruginosa* à l'épithélium pulmonaire chez ces patients (Baltimore *et al.*, 1989; Saiman *et al.*, 1992). Il a été observé une augmentation de la densité de glycolipides membranaires asialylés, les asialogangliosides-1 et -2 (asialo<sub>GM1</sub> et asialo<sub>GM2</sub>) à la surface des cellules épithéliales CF (Saiman et Prince, 1993). Ces molécules connues pour être des récepteurs à *P. aeruginosa* contiennent une séquence tétrasaccharidique, Gal <sub>$\beta$ 1-3</sub>GalNAc <sub>$\beta$ 1-4</sub>Gal <sub>$\beta$ 1-4</sub>Glc, qui constitue le site d'ancrage de la piline et de la flagelline de *P. aeruginosa* (Comolli *et al.*, 1999; de Bentzmann *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1994; Imundo *et al.*, 1995; McNamara *et al.*, 2001). Le mécanisme reliant le défaut de protéine CFTR à la sialylation n'est pas encore établi.

Par ailleurs, il a été montré que la protéine CFTR est capable d'interagir avec le lipopolysaccharide (LPS) de *P. aeruginosa* (Pier *et al.*, 1997; Pier *et al.*, 1996). Cette interaction permet l'internalisation de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales pulmonaires (Darling *et al.*, 2004), lesquelles desquament et sont ensuite éliminées par le mécanisme de clairance mucociliaire. La protéine CFTR sauvage permet l'internalisation de 10 à 50 fois plus de *P. aeruginosa* que la protéine CFTR  $\Delta$ F508 (Pier *et al.*, 1996). Ainsi, une diminution

du nombre de protéines CFTR fonctionnelles présentes à la surface apicale des cellules épithéliales favorise la survie de *P. aeruginosa* au niveau des poumons CF.

### 1.B.2.3- Emergence du phénotype mucoïde de *P. aeruginosa*

Au cours de l'infection de l'épithélium broncho-pulmonaire des patients CF par *P. aeruginosa*, on observe l'émergence de souches ayant acquis un phénotype dit mucoïde qui résulte de la production bactérienne d'exopolysaccharides de type alginate (Govan et Deretic, 1996; Sherbrock-Cox *et al.*, 1984).

D'un point de vue clinique, l'émergence d'un phénotype mucoïde de *P. aeruginosa* est corrélée à une détérioration significative des fonctions pulmonaires, laquelle est liée à un état d'infection chronique des poumons CF (Pedersen *et al.*, 1992). Les patients CF infectés par des souches de *P. aeruginosa* mucoïdes ont donc un pronostic vital compromis par rapport aux patients colonisés par des souches non mucoïdes.

Les alginates représentent un facteur de virulence puisqu'ils augmentent l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales et aux mucines et diminuent l'efficacité de la clairance ciliaire en augmentant la viscosité du mucus CF. De plus, ils enrobent les bactéries dans une matrice protectrice: le biofilm. Le biofilm protège *P. aeruginosa* de l'antibiothérapie, de l'opsonisation par le complément, de la phagocytose (Govan et Deretic, 1996), de la réponse immunitaire anti-pyocyanique (Costerton *et al.*, 1999) et de «l'explosion respiratoire» des PMNs (Jensen *et al.*, 1990; Jesaitis *et al.*, 2003; Kharazmi *et al.*, 1999).

### 1.B.2.4- Croissance sous forme de biofilm

L'une des caractéristiques de l'infection chronique à *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire est la formation du biofilm bactérien (Chicurel, 2000). Dans la mucoviscidose, la colonisation par *P. aeruginosa* se fait initialement par adsorption de souches bactériennes non mucoïdes sur la muqueuse buccale. La bactérie est alors libre et isolée: c'est l'état planctonique. Afin de coloniser les voies aériennes supérieures et inférieures, *P. aeruginosa* adhère à la surface de l'épithélium respiratoire à l'aide de ces différentes adhésines (O'Toole et Kolter, 1998; Vallet *et al.*, 2001) et forme des micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm: c'est l'état sessile (Costerton *et al.*, 1999) (figure I.3).

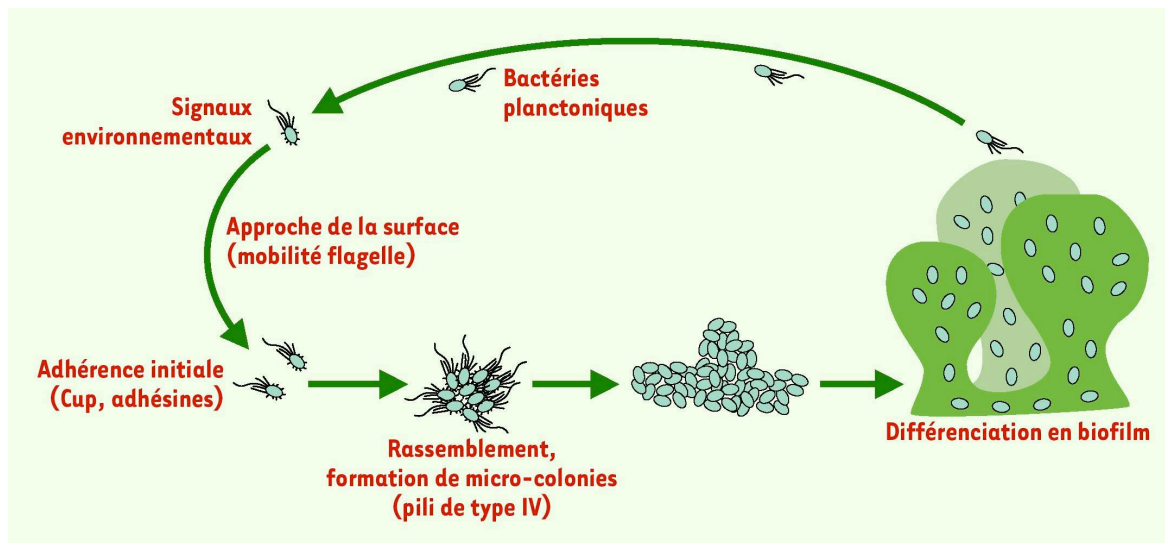


Figure I.3. Modèle de formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* (Filloux et Vallet, 2003).

L'attachement initial sur la surface fait intervenir un certain nombre d'adhésines, dont les facteurs d'attachement de type *fimbriae* (voie Cup, *chaperone/usher pathway*) et le flagelle (O'Toole et Kolter, 1998; Vallet *et al.*, 2001). La colonisation de la surface et le rassemblement en micro-colonies nécessitent d'autres appendices de mobilité, les pili de type IV (O'Toole et Kolter, 1998). La structuration des micro-colonies en biofilm mature implique la production d'une matrice d'exopolysaccharides mucoïdes (MEP), essentiellement composée d'alginate, qui enrobe les bactéries (Govan et Deretic, 1996; Whiteley *et al.*, 2001). Elle requiert également la répression de l'expression des différents appendices de mobilités. Il a été proposé par Bollinger *et al.* (2001) l'existence de deux voies indépendantes de formation du biofilm dans *P. aeruginosa*: une voie dans laquelle la production de MEP est quorum-sensing-indépendante et alginate-indépendante et une seconde voie dans laquelle la production de MEP est quorum-sensing-dépendante et alginate-dépendante.

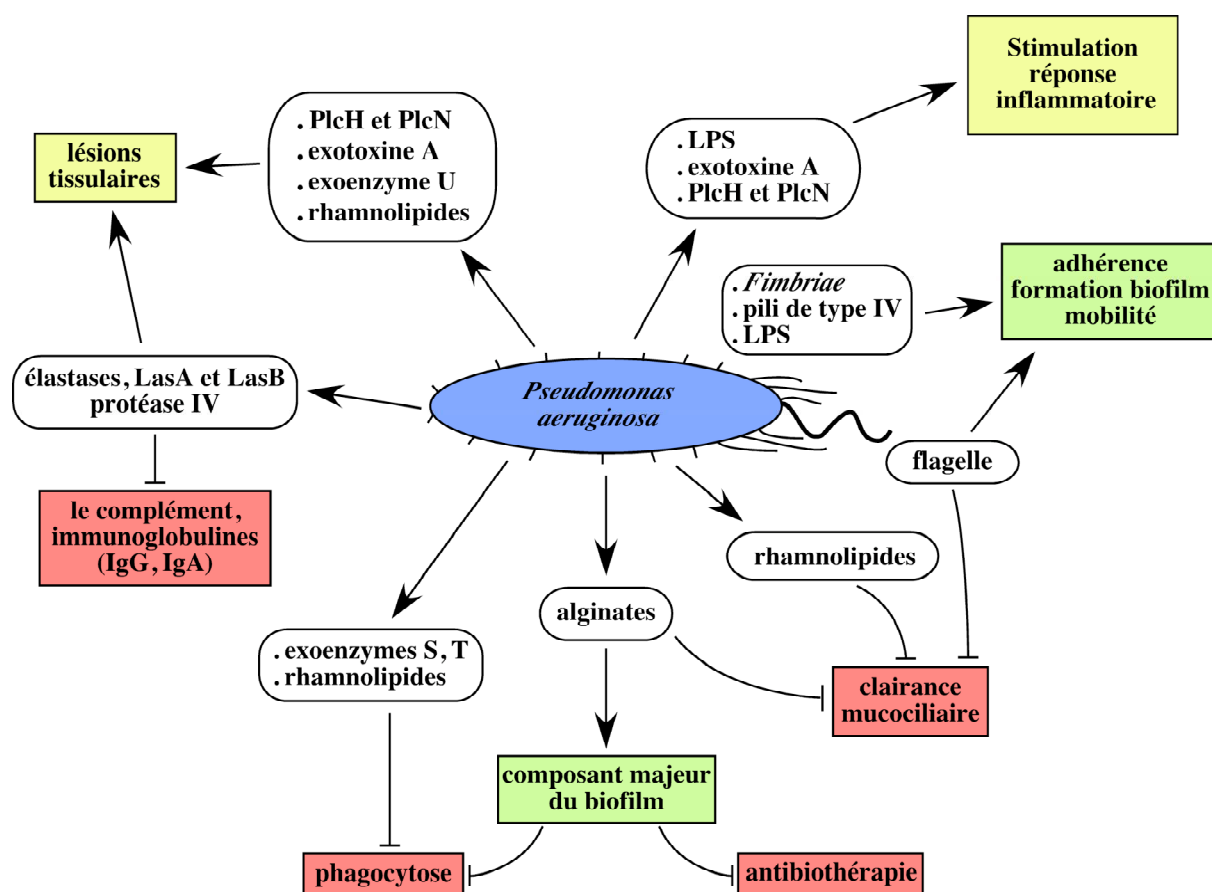
### 1.C- Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* synthétise de nombreux facteurs de virulence autres que les alginates, qui lui permettent de survivre aussi bien dans les différents hôtes que dans l'environnement (Lazdunski, 1998). Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du

processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte. Ils comprennent notamment:

- des facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa* qui permettent la colonisation de l'hôte. Les adhésines bactériennes sont typiquement des structures macromoléculaires assemblées à la surface bactérienne comme le flagelle, les pili de type IV, les *fimbriae* et les alginates. Le LPS intervient également dans l'adhésion de *P. aeruginosa* sur l'épithélium respiratoire (Pier, 2002; Pier *et al.*, 1996) (figure I.4).

- des toxines et des protéases qui provoquent des lésions tissulaires facilitant ainsi la multiplication et la dissémination bactérienne dans les tissus de l'hôte: l'exotoxine A, l'élastase, les phospholipases C, les rhamnolipides et les exoenzymes sécrétées par le système de sécrétion de type III (figure I.4).



**Figure I.4. Interactions entre les différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et son hôte.**

LPS: lipopolysaccharide de la membrane bactérienne; PlcH: phospholipase C hémolytique; PlcN: phospholipase C non hémolytique.



### 1.C.1- Facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa*

L'adhérence des bactéries à la cellule eucaryote cible ou à la surface tissulaire est un phénomène spécifique, qui requiert la participation de deux facteurs: un récepteur eucaryote et une adhésine bactérienne. Les récepteurs sont généralement des glucides ou des résidus peptidiques spécifiques de la cellule eucaryote.

#### 1.C.1.1- Le flagelle

*P. aeruginosa* possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité de type «swimming» mais qui intervient également dans la mobilité de type «swarming» (Kohler *et al.*, 2000). Le flagelle bactérien est une structure rotative actionnée par un moteur situé à la base, qui entraîne un filament agissant comme une hélice (Bardy *et al.*, 2003). Il est composé de trois principales structures: le filament qui permet la mobilité, le crochet et le corps basal ancré dans les membranes bactériennes. Le filament est constitué par l'empilement de monomères de flagelline (FliC). Ces monomères sont transportés à travers le filament et ajoutés à son extrémité distale avec l'aide d'une protéine de capping (FliD) (Bardy *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2000).

L'implication du flagelle dans la pathogénicité de nombreuses bactéries pathogènes, comme *P. aeruginosa*, a déjà été bien établie (Montie *et al.*, 1982). Des travaux, sur le modèle murin, montrent qu'un mutant dépourvu de flagelle est atténué dans sa virulence en particulier au niveau de la pneumonie et de la bactériémie (Tang *et al.*, 1996). Le flagelle serait également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires (Feldman *et al.*, 1998). Il joue un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien *in vitro* (O'Toole et Kolter, 1998).

Par ailleurs, la flagelline des flagelles bactériens est reconnue par le TLR5 (Toll-Like Receptor) (Hayashi *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). Le TLR5, comme les neuf autres TLRs, intervient dans la réponse immunitaire innée chez les vertébrés et les invertébrés (Lemaitre *et al.*, 1996). La stimulation du TLR5 va déclencher l'activation d'une cascade intracellulaire qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, puis à la production et à la sécrétion par les macrophages de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et l'interleukine IL-6 (Imler et Zheng, 2004; Means *et al.*, 2003).

### 1.C.1.2- Les pili de type IV

Le pilus de type IV est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Hahn, 1997). C'est une structure filamenteuse d'un diamètre externe de 6 nm, constituée par l'empilement de monomères de piline (Mattick, 2002). Contrairement au flagelle, il ne possède pas de canal au centre de la fibre ce qui exclut un schéma d'assemblage similaire au flagelle (Wall et Kaiser, 1999).

La biosynthèse et le fonctionnement du pilus sont complexes et impliquent de nombreux gènes. Ces gènes peuvent être divisés en quatre groupes : les régulateurs transcriptionnels (*pilR*, *pilS*, *fimS*, *algR* et *rpoN*), les gènes homologues aux gènes du chimiotactisme *che* (*pilG-L*, *chpA*, *B*), les gènes codant pour les protéines structurales (*pilA-F*, *pilM-Q*, *pilV-Z*, *fimT* et *fimU*) et les gènes impliqués dans le fonctionnement des pili (*pilT* et *pilU*). Le filament du pilus est principalement constitué de monomères de piline, PilA, assemblés en hélices, et de sous-unités minoritaires (PilV-X, PilE et FimU). PilA est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la prépiline. Celle-ci contient une courte séquence signal de 6 acides aminés, qui est nécessaire mais pas suffisante pour l'entrée de la piline dans la membrane cytoplasmique (Strom et Lory, 1993). Cette séquence signal est clivée du côté cytoplasmique par une peptidase, PilD, qui est une enzyme bifonctionnelle méthylant également l'extrémité N-terminale de la protéine mature. L'énergie nécessaire au processus d'assemblage serait fournie par PilB, protéine cytoplasmique qui possède des motifs de fixation des nucléotides. Le passage du pilus de type IV à travers la membrane bactérienne externe est réalisé par PilQ. Cette protéine appartient à la superfamille des sécrétines, lesquelles forment des complexes très stables de 12-14 sous-unités, avec un canal central variant de 5 à 10 nm (Thanassi et Hultgren, 2000).

Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type « twitching » (Wall et Kaiser, 1999) et de type « swarming » (Kohler *et al.*, 2000). Cette mobilité est fondée sur la capacité de rétraction de ces pili. De plus, ces structures interagissent *in vitro* avec la région glycosylée des glycosphingolipides asialo<sub>GM1</sub> et asialo<sub>GM2</sub>, située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Bryan *et al.*, 1998; de Bentzmann *et al.*, 1996; Imundo *et al.*, 1995; Saiman et Prince, 1993).

### 1.C.1.3- Facteur d'attachement de type *fimbriae* (ou Cup)

Un nouveau facteur d'attachement a été récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type *fimbriae* qui sont assemblés par la voie «*chaperone/usher*» pathway «Cup) (Vallet *et al.*, 2001). L'assemblage de pili de type fimbrial par la voie Cup a déjà été décrite chez *Escherichia coli* uropathogène et *H. influenzae* (Sauer *et al.*, 2000). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés (Vallet *et al.*, 2001). Ces trois systèmes sont codés respectivement par les gènes *cupA1-A5*, *cupB1-B6* et *cupC1-C3*, lesquels sont organisés en opéron (Vallet *et al.*, 2001).

L'assemblage d'adhésine par la voie «*chaperone/usher*» fait intervenir trois principaux éléments:

- (i) les sous-unités fimbriales (CupA1, A4) qui sont exportées par la machinerie Sec.
- (ii) une chaperone périplasmique (CupA2, A5) qui intervient dans l'assemblage des sous-unités fimbriales à la surface bactérienne.
- (iii) une protéine «*usher*» (CupA3) qui forme un canal dans la membrane externe permettant le passage du pili de type *fimbriae*.

Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques, comme le verre et le plastique, mais également dans la formation du biofilm (Vallet *et al.*, 2001).

### 1.C.1.4- Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, localisé dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est d'une part connu pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et d'autre part pour son activité endotoxique. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes.

La molécule de LPS peut être divisée en trois parties (Rocchetta *et al.*, 1999):

(i) le lipide A qui est une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe. Cette région, aussi appelée endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Kasai *et al.*, 1987; Lynn et Golenbock, 1992).

(ii) le cœur oligosaccharidique.

(iii) l'antigène-O qui est une région polysaccharidique variable. *P. aeruginosa* est capable de synthétiser deux formes de LPS appelées type A et type B, qui diffèrent par la composition polysaccharidique de leur antigène-O (Lam *et al.*, 1989).

Selon que l'antigène-O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un mutant isogénique possédant un phénotype rugueux (Cryz *et al.*, 1984). De plus, les souches «*rugueuses*» de *P. aeruginosa* sont lysées par le sérum humain, alors que les souches possédant un LPS lisse sont résistantes au sérum (Dasgupta *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 1983). Cet antigène O fonctionne comme un ligand pour l'association et l'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules de la cornée, et initie le développement de graves infections des yeux (Zaidi *et al.*, 1996). De plus, cette région externe est connue pour être un ligand de *P. aeruginosa* pour la protéine CFTR, qui joue un rôle crucial dans l'élimination de *P. aeruginosa* au niveau des poumons comme indiqué précédemment (paragraphe 1.C.2.2) (Pier, 2002; Pier *et al.*, 1996).

### **1.C.2- Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte**

Les toxines et les protéases impliquées dans la dissémination bactérienne sont sécrétées par différentes voies de sécrétion. Le système de sécrétion de type III (SSTT) de *P. aeruginosa* qui est en lui-même un facteur de virulence majeur fera l'objet d'un paragraphe séparé et par conséquent, il n'est pas inclus dans la liste, non exhaustive, présentée ci-dessous.

#### **1.C.2.1- L'exotoxine A**

L'exotoxine A (ETA) est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa* avec une DL50 (dose qui entraîne 50% de décès des animaux traités) de 0,2 µg pour une souris (Iglewski et Sadoff, 1979). Elle est sécrétée sous la forme d'une pro-toxine inactive de 71 kDa. Comme la toxine diphtérique, l'ETA est composée de deux domaines: le domaine A (26 kDa) qui possède l'activité mono-ADP-ribosyltransférase, comprise entre les résidus 400 et 608 (Gallant *et al.*, 2000), et le domaine B (45 kDa) qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte, permettant ainsi la translocation dans la cellule eucaryote cible (Allured *et al.*, 1986; Bell et Eisenberg, 1996; Vasil *et al.*, 1977).

Le récepteur de l'ETA est le LRP (LDL receptor-related protein) également appelé récepteur aux alpha-2-macroglobulines (Herz *et al.*, 1990). L'interaction de l'ETA avec son récepteur induit le clivage protéolytique du domaine B et l'internalisation dans la cellule hôte par endocytose du domaine catalytique (FitzGerald *et al.*, 1980; Iglewski *et al.*, 1977; Vasil *et al.*, 1977).

Une fois dans le cytoplasme de la cellule, l'ETA active catalyse le transfert d'un ADP-ribose du NAD<sup>+</sup> sur un résidu diphthamide du facteur d'élongation terminal E2 (Collier, 1975; Foley *et al.*, 1995; Iglewski et Kabat, 1975). Ceci entraîne un arrêt de la synthèse protéique eucaryote et provoque la mort de la cellule cible par nécrose (Wick *et al.*, 1990). L'ETA induit également l'apoptose des mastocytes humains par un mécanisme dépendant des caspases-8 et -3 (Jenkins *et al.*, 2004).

### 1.C.2.2- L'élastase

L'extension et la contraction du tissu pulmonaire repose sur les propriétés d'élasticité de l'élastine, qui est un composant majeur du tissu pulmonaire (30% des protéines pulmonaires). L'activité élastase de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB, codées respectivement par *lasA* et *lasB* (Galloway, 1991). Cette activité conduit à la destruction de tissu pulmonaire.

L'élastase LasB est une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante, puisque son activité sur la caséine est quatre fois plus importante que celle de la trypsine (Galloway, 1991). Cette protéase dégrade l'élastine mais elle est également capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA et les IgG (Heck *et al.*, 1990), des composants du complément (Hong et Ghebrehiwet, 1992), la fibrine et le collagène (Heck *et al.*, 1986), interférant ainsi avec les mécanismes de défense de l'hôte. L'élastase LasA est une protéase à sérine qui agit en synergie avec LasB pour dégrader l'élastine. LasA coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme LasB, la protéase alcaline et l'élastase du neutrophile (Galloway, 1991).

### 1.C.2.3- Les phospholipases C

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80 kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique (Zuckert *et al.*, 1998). Trois

phospholipases C (PLC) de spécificité de substrat différente ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (Ostroff *et al.*, 1990; Ostroff et Vasil, 1987; Stonehouse *et al.*, 2002).

- Une PLC non-hémolytique dénommée PlcN, qui hydrolyse la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine (Lazdunski, 1998).

- Une PLC hémolytique appelée PlcH. La PlcH est une enzyme multifonctionnelle puisqu'elle hydrolyse la phosphatidylcholine et la sphingomyéline (Lazdunski, 1998) mais elle possède également une activité sphingomyéline synthase (Luberto *et al.*, 2003). Cette PLC est un déterminant de la virulence des infections à *P. aeruginosa* dans de nombreux modèles (Hogan et Kolter, 2002; Hollsing *et al.*, 1987; Jander *et al.*, 2000; Ostroff *et al.*, 1989). La PlcN et la PlcH agissent préférentiellement sur la phosphatidylcholine qui est très abondante dans le surfactant pulmonaire, ce qui favorise ainsi la colonisation bactérienne des poumons.

- Récemment une troisième PLC a été identifiée. Il s'agit de la PlcB qui hydrolyse la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine (Barker *et al.*, 2004). Cette PlcB est impliquée dans la « twitching mobility » de *P. aeruginosa* suivant un gradient de dérivés de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine (Barker *et al.*, 2004).

Des phospholipases similaires ont été récemment découvertes chez des mycobactéries pathogènes (Stonehouse *et al.*, 2002), ce qui suggère un rôle analogue de ces phospholipases dans la physiopathologie de l'atteinte du tractus respiratoire par les mycobactéries (Johansen *et al.*, 1996).

#### **1.C.2.4- Les rhamnolipides**

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires composés de L-rhamnose et d'acide 3-hydroxyalkanoïque (Hauser et Karnovsky, 1957). En général, les rhamnolipides les plus abondants sont le L-rhamnosyl-3-hydroxydécanoyle-3-hydroxydécanoate et L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydécanoyle-3-hydroxydécanoate (Lang et Wullbrandt, 1999; Maier et Soberon-Chavez, 2000). Ces rhamnolipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes (Liu, 1974). Les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain (Read *et al.*, 1992). De plus, ils inhibent la phagocytose (McClure et Schiller, 1996) et sont également impliqués dans le maintien de l'architecture des biofilms (Davey *et al.*, 2003). Ils

contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa* et sont retrouvés en concentration élevée dans les crachats de patients CF infectés par cette bactérie (Kownatzki *et al.*, 1987).

La biosynthèse des rhamnolipides fait intervenir deux rhamnosyltransférases, codées par les gènes *rhlB* et *rhlC*, et une protéine associée à la membrane interne RhlA (Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b; Rahim *et al.*, 2001). L'expression de ces trois gènes est coordonnée et régulée par le système de quorum-sensing RhlR/RhlI (Ochsner et Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997; Rahim *et al.*, 2001).

Comme le flagelle et les pili de type IV, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type «swarming» (Kohler *et al.*, 2000) et la formation de biofilms (Davey *et al.*, 2003).

### 1.C.3- Régulation de l'expression de ces facteurs de virulence

Deux principaux mécanismes de régulation, les systèmes à deux composants et «two-component system», permettent d'adapter la synthèse protéique bactérienne à l'environnement de la bactérie. Ainsi, l'expression de la plupart des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* est généralement régulée par ces deux mécanismes, ce qui permet la survie et la multiplication de ce microorganisme dans l'hôte.

#### 1.C.3.1- Les systèmes de régulation à deux composants

Les systèmes à deux composants sont des systèmes de détection et de transduction de signal qui permettent à un organisme de répondre rapidement à une multitude de signaux environnementaux. Ils sont impliqués dans une grande variété de réponses régulatrices, comme par exemple la détection de l'hôte et l'invasion.

Le système le plus simple comporte deux protéines qui communiquent par transfert de phosphate d'un module «transmetteur» à un module «receveur», assurant ainsi la transduction du signal. Ces deux protéines sont:

- Une protéine histidine kinase appelée senseur, qui est souvent localisée dans la membrane cytoplasmique. Cette protéine est constituée d'un module «détecteur» dans sa région N-terminale et d'un module «transmetteur» dans sa région C-terminale. Le couplage de ces deux modules permet une modulation de l'activité du transmetteur. En réponse au

stimulus, cette protéine initie la transduction du signal en s'autophosphorylant sur un résidu histidine conservé du domaine transmetteur (Egger *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2000).

- Un régulateur de réponse cytoplasmique. C'est une phospho-transférase contenant un module «récepteur» dans son extrémité N-terminale et un ou des domaines «effecteurs» dans son extrémité C-terminale (Volz, 1993). Le domaine récepteur est phosphorylé sur un résidu aspartate conservé par phosphotransfert à partir du senseur. Cette phosphorylation va réguler l'activité du ou des domaines effecteurs. Ceci produit une réponse adaptée, qui se trouve être généralement une modification de l'expression des gènes.

Chez *P. aeruginosa*, il a été recensé un nombre très élevé de protéines putatives de systèmes de régulation à deux composants, avec 55 senseurs, 89 régulateurs de réponse et 14 hybrides senseur-régulateur de réponse (Rodrigue *et al.*, 2000; Stover *et al.*, 2000). Le nombre important de systèmes à deux composants putatifs dans *P. aeruginosa* pourrait permettre à ce microorganisme de détecter et de s'adapter à de nombreux changements d'environnement, et donc expliquer le fait qu'il soit très répandu dans la nature (Rodrigue *et al.*, 2000).

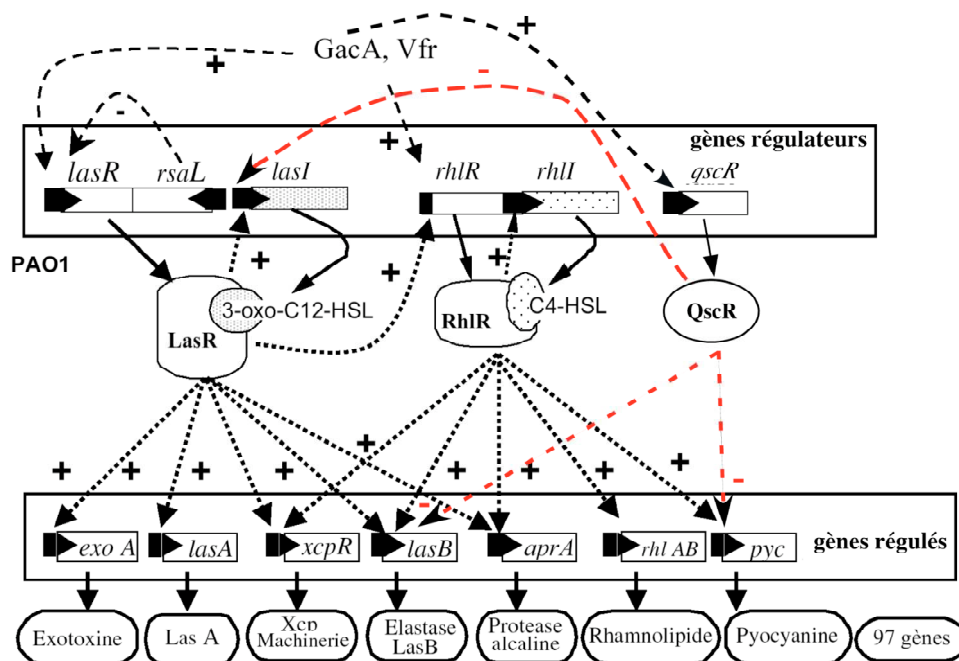
### 1.C.3.2- Le quorum-sensing

Chez *P. aeruginosa*, le quorum-sensing est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique (Parsek et Greenberg, 2000). Ce système de régulation est fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles, ce qui leur permet de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication bactérienne repose sur la production de phéromones diffusibles, des N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisées par une AHL-synthase qui est codée par un gène de type «*aiiA*» (inducteur). Lorsque la concentration de ces molécules diffusibles atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur transcriptionnel de type «*aiiR*». Le complexe ainsi formé va activer la transcription de gènes cibles dits de virulence mais également du gène «*aiiA*», d'où le terme de molécules auto-inductrices.

À ce jour, deux systèmes de quorum-sensing ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*: il s'agit de LasR/LasI et de RhlR/RhII, qui contrôlent de nombreux facteurs de virulence (Figure I.5) (Latifi *et al.*, 1996). Un homologue des régulateurs transcriptionnels LasR et



RhlR, appelé QscR (quorum-sensing controlled repressor) a été identifié en 2001 suite au séquençage du génome de la souche PAO1 (Chugani *et al.*, 2001). Ce régulateur QscR réprime la synthèse de facteurs de virulence comme l'élastase LasB et la pyocyanine (Chugani *et al.*, 2001; Ledgham *et al.*, 2003). QscR régulerait négativement les systèmes LasR/LasI et RhlR/RhII en interagissant avec les régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR (Ledgham *et al.*, 2003). Il peut donc être intégré dans le réseau complexe d'activation des deux systèmes de quorum-sensing de *P. aeruginosa* (Figure I.5). Contrairement aux systèmes LasR/LasI et RhlR/RhII, le système QscR ne possède pas d'auto-inducteur. Sa synthèse, comme celle de LasR et RhlR, est régulée positivement par le système à deux composants GacS/GacA (Ledgham *et al.*, 2003; Reimmann *et al.*, 1997). Toutefois, les signaux environnementaux qui activent ce système à deux composants ne sont pas encore connus. Par ailleurs, l'expression de LasR et RhlR est également induite par l'activateur transcriptionnel AMPc dépendant, Vfr (Virulence factor regulator) (Albus *et al.*, 1997).



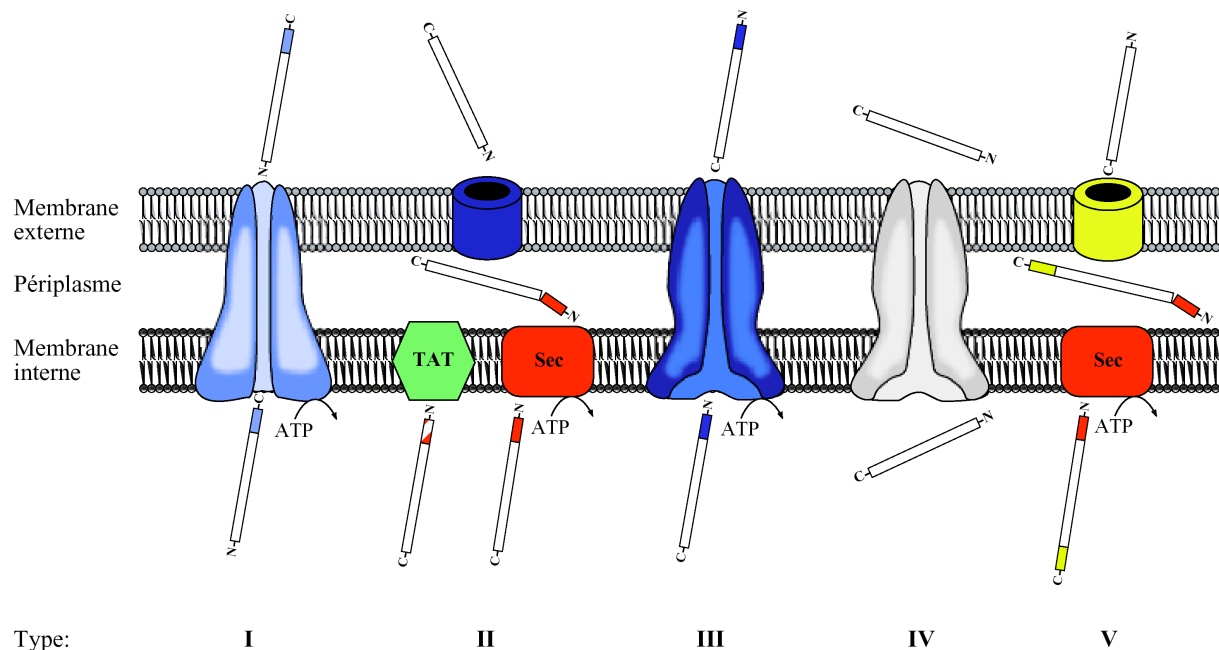
**Figure I.5. Mécanisme moléculaire du quorum-sensing chez *P. aeruginosa*** (adapté d'après Ruimy et Andremont, 2004).

Le signe (+) signifie une activation transcriptionnelle et le signe (-) une répression.

## 2- Les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif

Les facteurs de virulence nécessaires à la colonisation bactérienne de l'hôte sont généralement des protéines extracellulaires. Ces protéines doivent donc franchir les deux membranes bactériennes, toutes deux hydrophobes et donc imperméables aux composés hydrophiles. Pour se faire, les bactéries pathogènes à Gram négatif ont développé différents systèmes de sécrétion. Ainsi, cinq voies de sécrétion protéique (type I à V) ont été décrites chez ces bactéries (figure I.6).

Le terme «*sécrétion*» définit généralement le transport actif de protéines à travers les deux membranes bactériennes (interne et externe) alors que la «*translocation*», dans les systèmes de sécrétion de type III et IV, fait référence au passage des protéines à travers la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote.



**Figure I.6. Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion trouvés dans les bactéries à Gram négatif.**

Les protéines sécrétées par les voies de type I, III et IV traversent la membrane interne et la membrane externe en une seule étape, alors que les protéines sécrétées par les voies de type II et V traversent la membrane interne et la membrane externe en deux étapes séparées.

## 2.A- Le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I, également appelé transporteur ABC (ATP-binding-cassette) est indépendant de la voie de sécrétion Sec (figure I.6). Ce système de sécrétion est constitué de trois protéines essentielles:

(i) une protéine de transport ATPase, localisée dans la membrane interne, fournit l'énergie nécessaire au transport protéique.

(ii) une protéine de la membrane externe, exportée par le système de sécrétion Sec, forme le pore permettant la sécrétion.

(iii) une protéine de fusion membranaire, située dans l'espace périplasmique et ancrée dans la membrane interne, permet la fusion entre la membrane interne et externe (Dinh *et al.*, 1994).

Les gènes qui codent pour les constituants de cet appareil de sécrétion, ainsi que pour les protéines sécrétées, sont généralement organisés en opérons.

Les exoprotéines empruntant cette voie de sécrétion ont des caractéristiques communes: elles n'ont pas de peptide signal N-terminal et ont, dans la majorité des cas, un motif «Signal de sécrétion» d'une cinquantaine d'acides aminés, localisé en C-terminal (figure I.6). Cette séquence est nécessaire et suffisante pour promouvoir la sécrétion de la protéine (Mackman *et al.*, 1987).

Chez *P. aeruginosa*, on retrouve quatre transporteurs ABC dont le principal substrat est la protéase alcaline (Tommasen *et al.*, 1992).

## 2.B- Le système de sécrétion de type II (ou sécrétion Sec-dépendante)

La sécrétion de type II, également appelée «sécrétion Sec-dépendante» ou «Voie générale de sécrétion» (GSP, general secretory pathway), s'effectue en deux étapes qui ne sont pas couplées au niveau énergétique (figures I.6 et I.7).

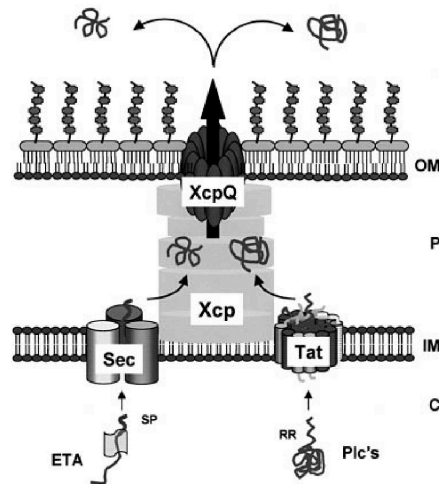
La première étape consiste au transport des protéines à travers la membrane bactérienne interne. Selon le substrat protéique, cette étape peut-être effectuée par deux systèmes de sécrétion différents (figure I.7).

- Soit par le système de sécrétion Sec-dépendant. La reconnaissance de la protéine par la machinerie Sec nécessite la présence d'une séquence signal d'une trentaine d'acides aminés hydrophobes en N-terminal de la protéine sécrétée. La protéine est ensuite exportée vers

l'espace périplasmique où une peptidase clivera le peptide signal. Chez *P. aeruginosa*, la machinerie Sec comprend des protéines de la membrane interne (SecD, E, F, G et Y), une ATPase cytoplasmique, associée à la membrane plasmique (SecA) qui produit l'énergie nécessaire pour le transport, une chaperone cytoplasmique (SecB) fixant et dirigeant la protéine sécrétée vers la machinerie Sec, et une peptidase périplasmique. D'autres protéines accessoires sont également nécessaires au fonctionnement normal du système (Pugsley, 1993). La phospholipase C PlcB, les élastases LasA et LasB ainsi que l'exotoxine A sont exportées dans le périplasme par cette voie de sécrétion (Barker *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2000).

- Soit par le système de translocation à double arginines, Tat (twin-arginine translocation). Contrairement à la voie de sécrétion Sec, la voie Tat permet d'exporter des protéines repliées de façon ATP-indépendante puisque le transport est dirigé par un gradient de pH (force proto-motrice) (Robinson et Bolhuis, 2001) (Figure I.7). Ce système nécessite également la présence d'une séquence signal d'une quarantaine d'acides aminés en N-terminal de la protéine à sécréter. Cette séquence contient un motif très conservé constitué de deux résidus arginines consécutif, (S/T)-R-R-x-F-L-K (Berks, 1996). Chez *P. aeruginosa*, la machinerie Tat est constituée de trois protéines de la membrane interne: TatA, B, C, dont les gènes sont organisés en opéron. Cette voie permet la sécrétion des phospholipases C, PlcH et PlcN (Voulhoux *et al.*, 2001).

La seconde étape correspond au transport des protéines exportées dans le périplasme à travers la membrane bactérienne externe. Chez *P. aeruginosa*, cette étape peut-être également réalisée par deux machineries de sécrétion, le système Xcp ou le système Hxc (homologous to xcp) (Ball *et al.*, 2002). La machinerie Xcp permet notamment le transport des élastases LasA et LasB, de l'exotoxine A, de PlcH et PlcN et les lipases (Filloux *et al.*, 1998) alors que la machinerie Hcx intervient dans le transport de la phosphatase alcaline de bas poids moléculaire (Ball *et al.*, 2002).



**Figure I.7. Modèle de la voie de sécrétion de type II chez *P. aeruginosa*** (Voulhoux *et al.*, 2001).

L'exotoxine A (ETA), contenant un peptide signal Sec, et les phospholipases C (PLCs) portant un peptide signal TAT, sont exportées à travers la membrane bactérienne interne respectivement par la machinerie Sec et TAT. Après clivage du peptide signal, les exoprotéines sont reconnues dans le périplasm par la machinerie Xcp, et sont sécrétées dans le milieu extérieur. C=cytoplasme; IM=membrane interne; P=périplasm; OM=membrane externe.

## 2.C- Le système de sécrétion de type IV

C'est une voie de sécrétion Sec-dépendante, absente chez *P. aeruginosa*, qui est capable de transporter une grande variété de substrat (figure I.6). Elle permet de délivrer directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible des complexes nucléoprotéiques (fragment T du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*) ou protéiques (cytotoxine CagA de *Helicobacter pylori*), mais également de sécréter des protéines dans le milieu extérieur, comme la toxine pertussique (*Bordetella pertussis*). Cette voie de sécrétion joue un rôle important dans la survie de bactéries intracellulaires, comme *Brucella suis* et *Legionella pneumophila*, dans la vacuole de phagocytose.

L'appareil de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens* est constitué de 4 groupes fonctionnels de protéines (Beijersbergen *et al.*, 1994; Burns, 1999; Cascales et Christie, 2003):

(i) deux ATPases cytoplasmiques associées à la membrane interne qui fournissent l'énergie nécessaire au processus de sécrétion.

(ii) un canal transmembranaire qui traverse les membranes interne et externe de la paroi, permettant le passage du complexe sécrété vers l'extérieur.

(iii) un pilus à la surface de la bactérie qui permet le contact avec la cellule eucaryote.

(iv) un canal transmembranaire permettant la translocation des complexes ADN-protéines dans le cytoplasme de la cellule cible.

## 2.D- Le système de sécrétion de type V

La voie de sécrétion de type V, également appelé auto-transporteur, est un mécanisme de sécrétion Sec-dépendant (figure I.6). Les protéines sont exportées dans le périplasme par la voie Sec, puis ces protéines réalisent elles-mêmes le pore permettant leur passage à travers la membrane bactérienne externe. L'extrémité C-terminale de la protéine sécrétée s'insère dans la membrane externe, et forme ainsi un pore à travers lequel la partie N-terminale de la protéine est sécrétée. La partie N-terminale est ensuite relâchée dans le milieu extérieur par clivage protéolytique. L'estérase, EstA, de *P. aeruginosa* est sécrétée par cette voie.

## 2.E- Le système de sécrétion de type III (SSTT)

La voie de sécrétion de type III, par sa composition et son fonctionnement, est la plus complexe des voies de sécrétion bactériennes connues. En effet, ce mécanisme de sécrétion permet à la bactérie d'injecter des facteurs cytotoxiques directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible afin de perturber des processus cellulaires et de réprimer les défenses de l'hôte (Figure I.6 et I.8) (Cornelis et Van Gijsegem, 2000). D'un point de vue génétique, le SSTT est codé par une trentaine de gènes généralement organisés en opéron. Ces derniers sont soit regroupés dans des régions chromosomiques de 20 à 40 kilobases appelées «*îlots de pathogénicité*», soit portés par un plasmide comme le plasmide pYV (plasmid *Yersinia* Virulence) chez *Yersinia* spp. Les protéines codées par ces gènes ont des fonctions très diverses et sont classifiées en cinq groupes

(i) les constituants de l'appareil de sécrétion ou «*injectisome*» qui permet le passage des protéines sécrétées à travers les deux membranes bactériennes. L'énergie nécessaire au

processus de transport est fournie par une ATPase cytoplasmique associée à la membrane interne de type pompe à protons F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> (PscN chez *P. aeruginosa*).

(ii) les protéines composant le canal transmembranaire multi-protéique qui permet le passage des effecteurs cytotoxiques à travers la membrane de la cellule eucaryote. Ce canal appelé «translocon de type III» sera l'objet de la dernière partie de cette introduction.

(iii) les protéines chaperones.

(iv) les protéines effectrices qui sont transloquées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes infectées.

(v) les protéines régulatrices qui interviennent dans la régulation transcriptionnelle des gènes du SSTT mais également dans la régulation de l'activation de la sécrétion de type III.

Le fonctionnement du SSTT, comme celui des transporteurs ABC, ne fait pas intervenir d'intermédiaire périplasmique et ne nécessite pas directement la machinerie Sec. Toutefois, le SSTT est indirectement Sec-dépendant puisque la mise en place des protéines qui constituent l'injectisome est Sec-dépendante.

Par ailleurs, les protéines sécrétées via le SSTT n'ont pas besoin de subir de clivage de séquence signal N-terminale pour être sécrétées. La nature de la séquence «signal de sécrétion» des protéines du SSTT est très controversée (Ramamurthi et Schneewind, 2003a). En effet, de nombreuses études suggèrent que le signal de sécrétion réside dans les 15 à 20 premiers acides aminés N-terminaux des protéines sécrétées, puisque cette séquence est nécessaire et suffisante à la sécrétion de ces protéines (Cornelis *et al.*, 1998; Lloyd *et al.*, 2001; Lloyd *et al.*, 2002; Russmann *et al.*, 2002). Cependant, l'alignement des séquences N-terminales des protéines sécrétées par le SSTT ne révèle aucune homologie de séquences, ce qui remet en cause l'existence d'un peptide signal spécifique au SSTT. De plus, des travaux réalisés dans le laboratoire du Dr. Schneewind montrent que la mutagenèse dirigée de ce peptide signal putatif n'affecte pas la sécrétion de certaines protéines du SSTT (Anderson *et al.*, 1999; Anderson et Schneewind, 1997; Ramamurthi et Schneewind, 2002; Ramamurthi et Schneewind, 2003b), tout comme des changements du cadre de lecture du peptide signal putatif (Anderson et Schneewind, 1997; Cheng *et al.*, 1997; Ramamurthi et Schneewind, 2002). Ainsi, Schneewind et ces collaborateurs ont proposé que le signal de sécrétion résiderait dans la structure secondaire de la région 5' des ARNm qui codent pour les protéines sécrétées du SSTT (Anderson *et al.*, 1999). Cette région formerait une structure «ge-boucle» qui permettrait l'interaction avec l'appareil de sécrétion (Anderson *et al.*, 1999). L'hypothèse d'un signal de sécrétion codé par l'ARNm signifie que la sécrétion est co-

traductionnelle, or ce n'est pas le cas de YopE qui est une protéine effectrice sécrétée par le SSTT de *Yersinia* spp. (Lloyd *et al.*, 2001).

## 2.E.1- Diversité et origine du SSTT

### 2.E.1.1- Diversité du SSTT

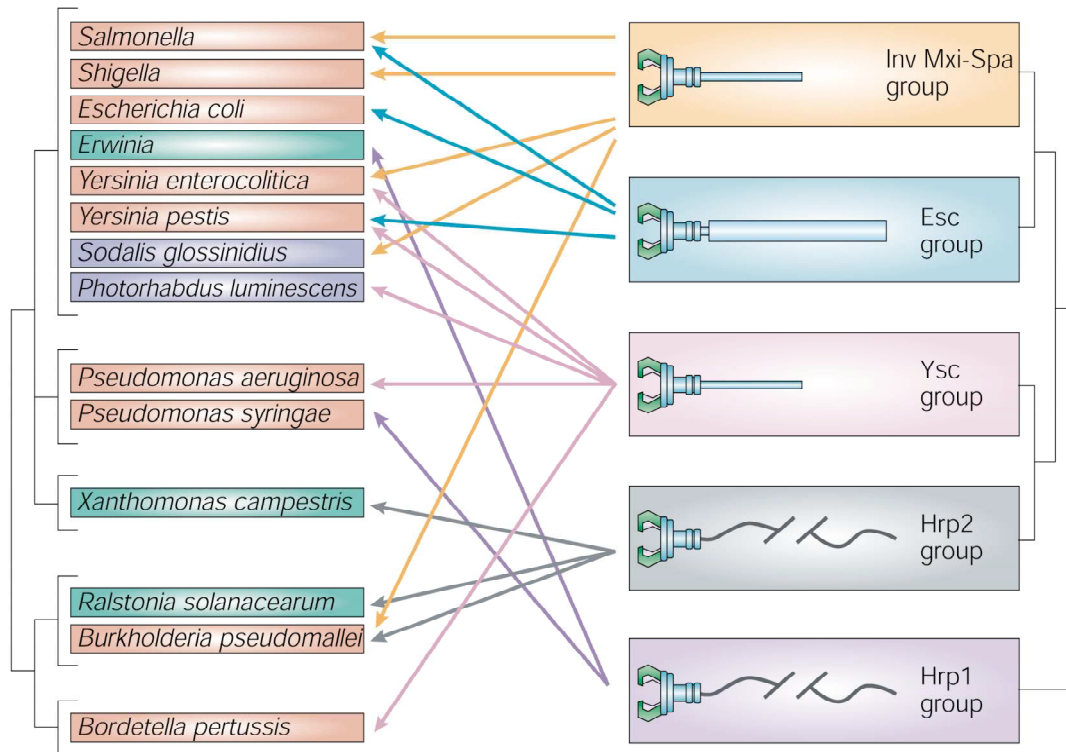
Cette voie de sécrétion est commune à de nombreuses bactéries à Gram négatif aussi bien pathogènes d'animaux, comme *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli* entéropathogène (EPEC) et entérohémorragique, *Chlamydia* spp., *Burkholderia* spp. et *Bordetella* spp., que phytopathogènes telles que *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas* spp. (Hueck, 1998).

Chez les bactéries pathogènes d'animaux, le SSTT confère des effets biologiques différents selon les espèces. *Shigella* spp. et *S. typhimurium*, qui sont des bactéries dites invasives, utilisent le SSTT pour induire leur internalisation par macropinocytose dans les cellules épithéliales intestinales, ainsi que pour se répliquer ou lyser la vacuole de phagocytose (Finlay et Cossart, 1997). Chez *Yersinia* spp. et *P. aeruginosa*, le SSTT confère un effet cytotoxique, permettant notamment de neutraliser l'action des phagocytes professionnels (Cornelis, 1998).

L'analyse phylogénique basée sur les protéines de la famille YscV du SSTT des différentes bactéries pathogènes ont permis de classer ces SSTT en cinq familles (figure I.8, arbre de droite) (Cornelis, 2002; Foultier *et al.*, 2002). On peut observer sur cette figure que certains pathogènes, comme *Salmonella*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* et *B. pseudomallei*, possèdent deux SSTT de familles différentes. Par exemple, chez *Salmonella*, ces deux SSTT interviennent à différentes étapes du processus d'infection.

Par ailleurs, l'arbre phylogénétique bactérien, basé sur l'ARNr 16S, diffère totalement de l'arbre phylogénétique des SSTT de ces bactéries (figure I.8). Cette divergence entre ces deux arbres phylogénétiques indique que ces bactéries ont acquis leur SSTT par des transferts horizontaux de gènes (Cornelis, 2002; Foultier *et al.*, 2002; Gophna *et al.*, 2003).





**Figure I.8. Comparaison entre les arbres phylogénétiques réalisés avec les séquences des protéines de la famille de YscV des différents SSTT (à droite) et les séquences d'ARNr 16S (à gauche) des espèces mentionnées dans la figure (Cornelis, 2002).**

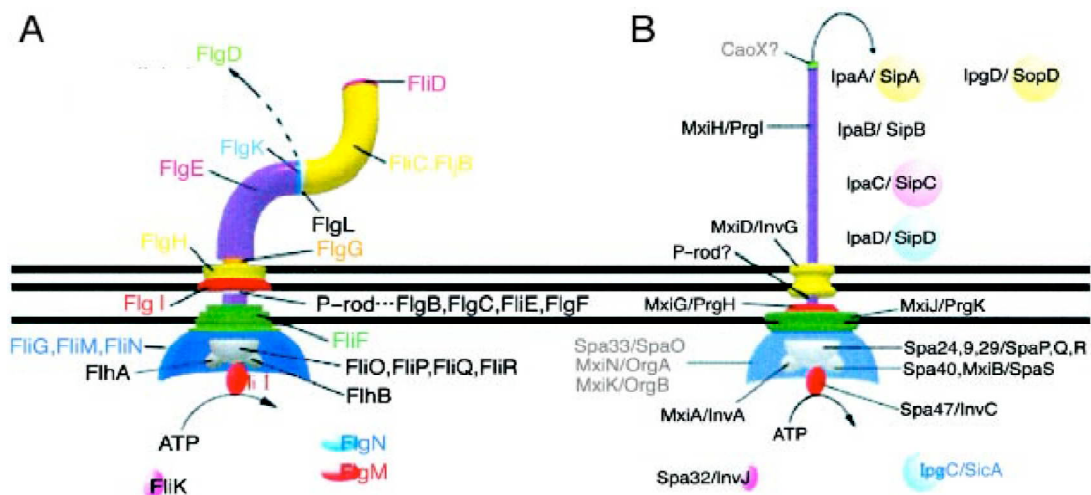
### 2.E.1.2- Origine du SSTT

Une voie de sécrétion de type III est également requise pour la biosynthèse du flagelle bactérien (Macnab, 1999) ainsi que pour l'établissement de la relation symbiotique entre *Rhizobium* et les végétaux (Viprey *et al.*, 1998).

La voie d'exportation flagellaire de *S. typhimurium*, qui a fait l'objet de nombreuses études, présente de nombreuses similarités avec le SSTT:

- Au niveau structural, l'analyse par microscopie électronique à basse résolution du système flagellaire et du SSTT a révélé des similarités morphologiques entre ces deux systèmes, notamment au niveau du corps basal qui est inséré dans la paroi bactérienne (figure I.9) (Aizawa, 1996; Blocker *et al.*, 2003). Le flagelle bactérien est composé de trois éléments (figure I.9A): le corps basal qui ancre la structure dans l'enveloppe bactérienne, un crochet et un filament. Il est suggéré que le crochet flagellaire soit la structure analogue à l'aiguille de l'appareil du SSTT, et ceci malgré leur différence de forme et de diamètre (Aizawa, 2001). En

effet, le composant du crochet, FlgE, et le composant de l'aiguille dans les différents SSTT possèdent des propriétés physico-chimiques similaires (index d'instabilité, pH isoélectrique et index aliphatique) (Aizawa, 2001). Cependant, la protéine FlgE (environ 430 acides aminés) est beaucoup plus grande que le composant de l'aiguille (en moyenne 80 résidus). Cette différence de taille entre ces protéines pourrait expliquer la différence de diamètre entre l'aiguille du SSTT (8 nm) et le crochet flagellaire (20 nm) (Aizawa, 2001).



**Figure 1.9. Diagrammes comparant la position des différents composants flagellaires connus (A) avec celle de leurs homologues fonctionnels connus ou hypothétiques du SSTT (B)** (Blocker *et al.*, 2003).

Les protéines dont la fonction est conservée entre les deux systèmes sont indiquées par une position, une forme et une coloration identiques. Les protéines du SSTT pour lesquelles aucune homologie n'a été établie avec des composants flagellaires positionnés au même endroit et de la même couleur en (A) sont indiquées en gris en (B).

- Des similarités de séquences sont observées entre une dizaine de protéines qui constituent le HBB du flagelle (hook-basal bodies) et la partie basale de l'appareil de sécrétion de type III (Kubori *et al.*, 1998; Macnab, 1996) (figure I.9). De plus, une conservation fonctionnelle est retrouvée entre les protéines qui ne montrent pas d'homologie de séquences significative, puisque l'absence de ces constituants entraîne des phénotypes similaires dans l'assemblage ou le fonctionnement de ces deux appareils d'exportation (Blocker *et al.*, 2003).

- Au niveau fonctionnel, des similarités sont observées entre les chaperones spécifiques à ces deux systèmes d'exportation de type III (Bennett et Hughes, 2000). Outre leurs rôles de prévention de la dégradation et d'agrégation de leurs protéines substrats, ces chaperones jouent également un rôle dans la régulation de l'expression des protéines constituant l'aiguille ou le flagelle (Aldridge et Hughes, 2002; Bennett et Hughes, 2000).

Ces nombreuses similarités entre la voie d'exportation flagellaire et le SSTT suggèrent une relation étroite entre ces deux voies (Galan et Collmer, 1999). Deux hypothèses ont été émises sur l'origine du SSTT. La première hypothèse suppose que la voie d'exportation flagellaire serait l'ancêtre de la voie de sécrétion de type III (Macnab, 1999). En effet, selon Macnab, la sécrétion des éléments flagellaires à travers les membranes bactériennes se fait par un mécanisme identique à la voie de sécrétion de type III mais diffère par la nature des substrats exportés (Macnab, 1999). D'autre part, Aizawa a suggéré que ces deux systèmes aient un ancêtre commun et qu'ils aient évolué en parallèle (Aizawa, 2001). Des travaux de Young *et al.* renforcent cette hypothèse d'une origine évolutive commune. Ces auteurs ont montré que la phospholipase extracellulaire YplA, qui est associée à la virulence de *Y. enterocolitica*, peut être aussi bien sécrétée par la machinerie d'exportation flagellaire que par les deux SSTT de *Yersinia*, Ysc et Ysa (Young et Young, 2002; Young *et al.*, 1999).

### 2.E.2- L'appareil de sécrétion de type III

L'injectisome, selon le SSTT des espèces bactériennes, est constitué d'une vingtaine de protéines dont la quasi-totalité est essentielle au fonctionnement. L'analyse comparative entre les protéines qui composent l'injectisome du SSTT de différentes espèces bactériennes a mis en évidence la conservation de onze familles de protéines entre ces différents SSTT (tableau I.1) (Hueck, 1998). Ces protéines constituent « le cœur conservé » du corps basal de l'injectisome, lequel pourrait être impliqué dans la reconnaissance d'un motif signal de sécrétion universel à tous les SSTT (Anderson *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 2001).

La partie du corps basal insérée dans la membrane bactérienne interne est une structure en forme d'anneau composée notamment des protéines des familles YscD, YscJ, YscR, YscS, YscT, YscU et YscV. Les trois protéines des familles YscR, YscU et YscV interagiraient avec les protéines périphériques des familles YscL et YscN. La lipoprotéine (famille YscJ) ferait le lien à travers l'espace périplasmique entre le complexe multi-

protéique, inséré dans la membrane interne, et le pore, formé par l'oligomérisation de la sécrétine (famille YscC), localisé dans la membrane bactérienne externe (Crago et Koronakis, 1998; Deng et Huang, 1999; Koster *et al.*, 1997). L'injectisome fonctionne donc comme un conduit creux (50 Å) qui permet le passage en une seule étape des protéines sécrétées à travers les deux membranes bactériennes et le peptidoglycane (Koster *et al.*, 1997).

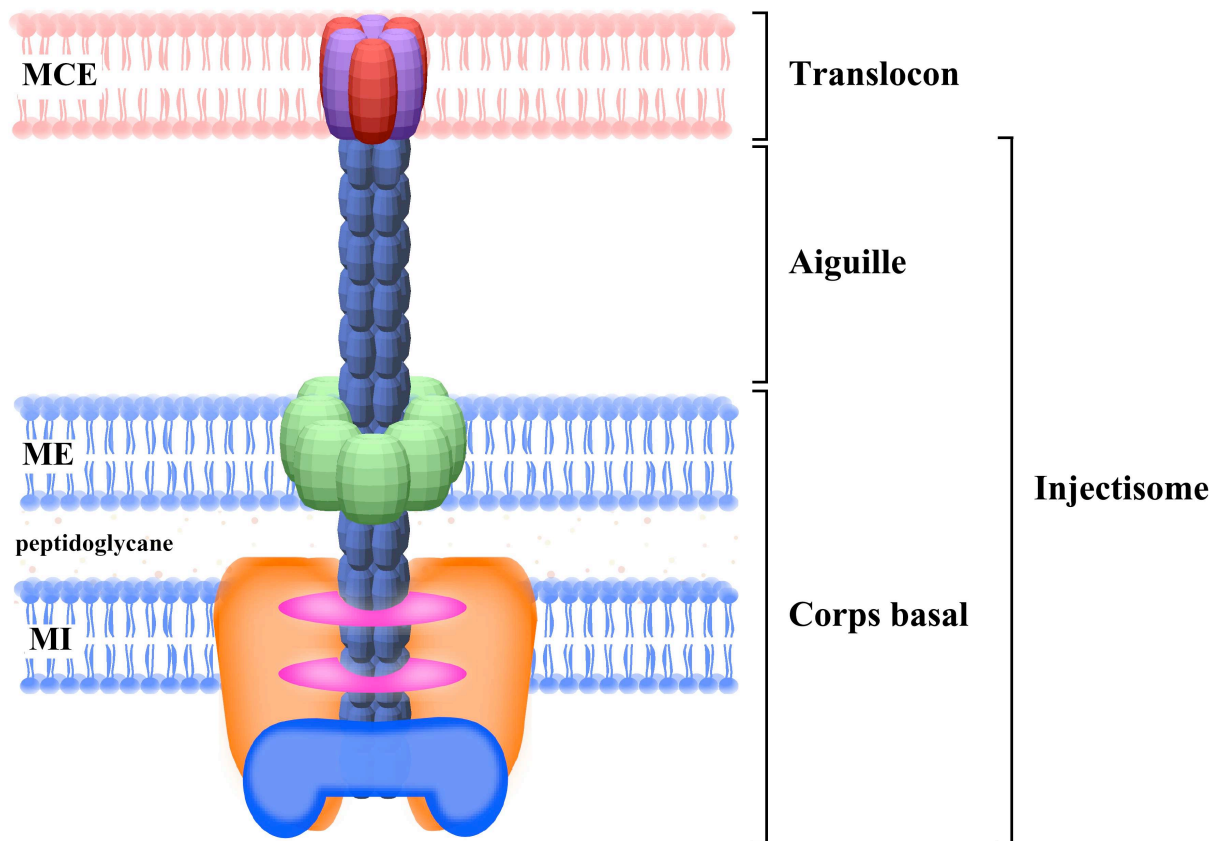
<i>Yersinia spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> (SPI-1)	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Shigella flexneri</i>	Localisation cellulaire, fonctions, caractéristiques
YscC	PscC	InvG	HrcC	MxiD	Protéine de la famille des sécrétine insérée dans la ME
YscD	PscD	InvE	HprQ	MxiC, MxiN	Protéine membranaire intégrale de la MI
YscJ	PscJ	PrgK	HrcJ	MxiJ	Lipoprotéine, connecteur putatif de l'appareil de sécrétion dans le périplasme
YscL	PscL	OrgB	HrpE	MxiN	Protéine cytoplasmique capable d'interagir avec YscQ et YscN
YscN	PscN	InvC	HrcN	Spa47	ATPase cytoplasmique apparentée aux sous-unités catalytiques des ATPases F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> bactériennes
YscQ	PscQ	SpaO	HrcQ	Spa33	Protéine périphérique de la membrane interne capable d'interagir avec YscL et YscK
YscR	PscR	SpaP	HrcR	Spa24	Protéine membranaire intégrale de la MI avec de larges domaines hydrophiles cytoplasmiques
YscS	PscS	SpaQ	HrcS	Spa9	Protéine membranaire intégrale de la MI
YscT	PscT	SpaR	HrcT	Spa29	Protéine membranaire intégrale de la MI
YscU	PscU	SpaS	HrcU	Spa40	Protéine membranaire intégrale de la MI avec de larges domaines hydrophiles cytoplasmiques
YscV (LcrD)	PcrD	InvA	HrcV	MxiA	Protéine membranaire intégrale de la MI avec de larges domaines hydrophiles cytoplasmiques

**Tableau I.1. Famille des protéines de l'injectisome du SSTT très conservées entre les différentes espèces bactériennes.** ME, membrane externe; MI, membrane interne (Aizawa, 2001; Hueck, 1998; Plano *et al.*, 2001; Tampakaki *et al.*, 2004).

Les injectisomes de *S. typhimurium*, *S. flexneri* et de *E. coli* entéropathogène ont été isolés. Leur visualisation supra-moléculaire évoque une véritable «seringue» (figure I.10) (Blocker *et al.*, 2001; Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 2001; Tamano *et al.*, 2000). Cette structure, d'une longueur d'environ 80 nm chez *S. flexneri*, est composée de deux domaines clairement identifiables (Tamano *et al.*, 2000) (figure I.10):

(i) un domaine basal en forme de cylindre qui ancre l'injectisome dans les membranes bactériennes (environ 32 nm).

(ii) l'aiguille, proprement dite, qui est érigée au-dessus de la surface bactérienne (environ 45 nm).



**Figure I.10. Représentation modélisée du système de sécrétion de type III.**

Les protéines qui composent la paire d'anneaux (en violet) insérée dans la membrane bactérienne interne (MI) ainsi que la sécrétine (en vert) insérée dans la membrane externe (ME) sont sécrétées par la machinerie de sécrétion Sec. Le composant majeur de l'aiguille (en bleu foncé) se prolonge de la base de la structure jusqu'au pore de translocation inséré dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote (MCE). Les protéines membranaires intégrales (en orange) et les protéines cytoplasmiques associées aux membranes sont des composants du corps basal (en bleu).

Le mécanisme qui permet de contrôler la longueur de l'aiguille n'est pas encore bien connu et semble différer selon les espèces bactériennes. En effet, la longueur de l'aiguille de *Shigella* spp., comme celle du crochet flagellaire, serait régulée par un mécanisme dépendant du niveau de production des sous-unités individuelles qui constituent ces structures (Muramoto *et al.*, 1999; Tamano *et al.*, 2000). Récemment, Journet *et al.* ont montré que chez *Yersinia* spp., la longueur de l'aiguille de l'injectisome est contrôlée par la protéine YscP. Durant l'étape d'assemblage de l'aiguille, cette protéine agirait comme une «*régule moléculaire*», qui signalerait à l'appareil d'exportation que l'aiguille a atteint sa longueur finale, lequel arrêterait, par conséquent, la sécrétion des sous-unités structurales YscF (Journet *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la longueur de l'aiguille reflète probablement la distance entre la bactérie et la membrane de la cellule hôte après adhésion. Les bactéries présenteraient donc des aiguilles de longueur variable selon le type cellulaire qu'elles infectent. Par exemple, l'infection de cellules hôtes présentant une épaisse couche de mucus ou des microvilli va nécessiter des aiguilles plus longues pour injecter les effecteurs dans le cytoplasme (Thomas et Finlay, 2004)

### 2.E.3- Les protéines chaperones du SSTT

L'activation de la sécrétion de type III est induite par des signaux environnementaux. Or, la sécrétion de type III n'est probablement pas co-traductionnelle. Les protéines sécrétées doivent donc être stockées dans le cytoplasme bactérien, ce qui nécessite une association de ces protéines à des chaperones spécifiques, appelées chaperones de la voie de sécrétion de type III (chaperones STT). Ces chaperones STT ne montrent pas d'homologie de séquences significative, néanmoins elles ont plusieurs caractéristiques biochimiques communes. Ce sont généralement des protéines de bas poids moléculaire (< 15 kDa), de pH isoélectrique acide (< 5), qui possèdent une hélice  $\alpha$  amphiphile putative dans leur région C-terminale (Page et Parsot, 2002; Wattiau *et al.*, 1994). Ces chaperones sont divisées en deux classes: les chaperones de classe I qui s'associent à une (classe IA) ou plusieurs (classe IB) protéines effectrices et les chaperones de classe II qui s'associent avec les deux protéines translocatrices (Cornelis et Van Gijsegem, 2000; Parsot *et al.*, 2003).

Les chaperones de classes IA et II sont codées par des gènes localisés à proximité des gènes codant pour leurs substrats alors que les chaperones de classe IB sont codées par des

gènes situés dans les opérons qui codent pour l'appareil de sécrétion (Cornelis et Van Gijsegem, 2000).

Les chaperones de classe IA agissent sous forme dimérique et lient la région N-terminale de leur protéine substrat (Feldman et Cornelis, 2003). L'archétype de ces chaperones est la chaperone de YopE, appelée SycE (specific Yop chaperones) chez *Y. enterocolitica* (Wattiau et Cornelis, 1993). L'association de SycE à YopE permet de stabiliser et de protéger YopE de la protéolyse dans le cytosol bactérien (Cheng *et al.*, 1997), mais également de masquer une région de YopE (résidus 50 à 77) responsable de l'agrégation de cette protéine (Boyd *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2002). Ces chaperones, notamment SycE, pourraient représenter un signal de sécrétion qui permet d'augmenter l'efficacité de la sécrétion des effecteurs (Cheng et Schneewind, 2000). De plus, l'analyse cristallographique du complexe SycE-N<sub>ter</sub>:YopE révèle une structure semblable à celle de la région N-terminale de l'effecteur de *Salmonella* SptP complexée avec sa chaperone SicP (Birtalan *et al.*, 2002; Stebbins et Galan, 2001). Ceci suggère que le complexe SycE-N<sub>ter</sub>:YopE pourrait fonctionner comme un signal tri-dimensionnel pour la sécrétion (Birtalan *et al.*, 2002). Birtalan *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse que ce signal tri-dimensionnel permettrait une hiérarchisation temporelle de la sécrétion, et que les effecteurs associés à une chaperone seraient sécrétés en premier. En effet, un macrophage est capable de phagocyter une bactérie en moins d'une minute, il est donc prioritaire pour *Yersinia* de sécréter rapidement ses facteurs antiphagocytiques afin de survivre dans le milieu extracellulaire de l'organisme hôte. Or, chez *Yersinia*, seuls les effecteurs ayant une activité anti-phagocytose (YopE, YopH et YopT) possèdent une chaperone (Feldman et Cornelis, 2003) et l'effecteur YopH est délivré dans les macrophages dans la minute qui suit l'infection (Andersson *et al.*, 1996). Cette hypothèse d'une hiérarchisation temporelle de la sécrétion est renforcée par les travaux de Boyd *et al.* (2000) qui montrent que l'association à une chaperone confère à l'effecteur un avantage pour la sécrétion mais également qu'il y aurait une compétition entre les différents effecteurs Yop pour la sécrétion. Il est également attribué à ces chaperones de la classe IA, la capacité de maintenir les effecteurs dans une conformation non repliée compétente avec la sécrétion (Feldman *et al.*, 2002).

L'association des chaperones de classe II comme IpgC chez *Shigella* spp., LcrH (ou SycD) chez *Yersinia* spp., SicA chez *Salmonella* spp., aux protéines translocatrices permet de prévenir une possible agrégation de ces protéines, liée à leurs régions hydrophobes mais également d'empêcher des interactions prématurées entre ces protéines (Menard *et al.*, 1994; Neyt et Cornelis, 1999b; Tucker et Galan, 2000). De plus, un rôle de régulateur de

l'expression des protéines constituant le SSTT a été attribué à ces chaperones. En effet, SicA et IpgC sont des co-activateurs de l'activateur transcriptionnel de leur SSTT, respectivement InvF et MxiE (Darwin et Miller, 2001; Mavris *et al.*, 2002a; Mavris *et al.*, 2002b). Il a été montré que InvF active la transcription de gènes impliqués dans le SSTT uniquement lorsqu'il est complexé à SicA (Darwin et Miller, 2001). À l'inverse de ces deux chaperones co-activatrices, LcrH intervient dans la boucle de régulation négative de l'expression des protéines sécrétées par le SSTT de *Yersinia* spp. (Francis *et al.*, 2001).

#### 2.E.4 - Les protéines effectrices du SSTT de *P. aeruginosa*

Le SSTT de *P. aeruginosa* est un facteur de virulence majeur. En effet, il a été montré que les patients infectés par des souches de *P. aeruginosa* qui possèdent un SSTT fonctionnel, présentent une augmentation de la fréquence des bactériémies et des lésions d'organes, ainsi qu'un taux de mortalité six fois plus élevé que les patients infectés par des souches n'exprimant pas le SSTT (Roy-Burman *et al.*, 2001). Cette virulence est associée aux quatre protéines effectrices, également appelées cytotoxines ou exoenzymes, sécrétées par le SSTT: ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.

Les gènes qui codent pour ces exoenzymes sont localisés sur le chromosome bactérien, à l'extérieur du locus du SSTT, et ils sont répartis de façon hétérogène parmi les souches de *P. aeruginosa* (Berthelot *et al.*, 2003; Feltman *et al.*, 2001; Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Fleiszig *et al.*, 1997). Des différences de prévalence des gènes *exoS* et *exoU* en fonction de l'origine des souches de *P. aeruginosa* ont notamment été mises en évidence par différentes études (Berthelot *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2000; Feltman *et al.*, 2001; Lomholt *et al.*, 2001). Une forte prévalence du gène *exoS* a été observée dans les isolats cliniques issus de patients CF (Dacheux *et al.*, 2000), ainsi que dans les souches issues de pathologies respiratoires (Lomholt *et al.*, 2001). Par contre, une faible prévalence du gène *exoS* est retrouvée dans les souches isolées d'infections cornéennes, auriculaires et urinaires (Berthelot *et al.*, 2003; Fleiszig *et al.*, 1996; Frithz-Lindsten *et al.*, 1997; Lomholt *et al.*, 2001). Contrairement à *exoS*, le gène *exoU* n'est quasiment jamais retrouvé dans les isolats cliniques issus de patients CF (Dacheux *et al.*, 2000; Feltman *et al.*, 2001). Il apparaît donc, sauf exception, que les gènes *exoS* et *exoU* sont mutuellement exclusifs (Berthelot *et al.*, 2003; Feltman *et al.*, 2001; Fleiszig *et al.*, 1997; Lomholt *et al.*, 2001; Wolfgang *et al.*, 2003a). L'isolat clinique CHA utilisé au laboratoire possède les gènes *exoS*, *exoY* et *exoT*, comme environ 60% des souches de l'étude de Lomholt *et al.* (2001).



### 2.E.4.1- L'exoenzyme S

L'exoenzyme S est la cytotoxine la mieux caractérisée actuellement. Cet effecteur est principalement transloqué dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible mais il est également sécrété dans le milieu extracellulaire (Barbieri, 2000; Woods *et al.*, 1988). Il possède une chaperone cytoplasmique codée par le gène *orf1* qui augmente l'efficacité de sa sécrétion (Yahr *et al.*, 1996).

ExoS est une protéine bifonctionnelle de 49 kDa. D'une part, elle possède une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho (protéines Rho, Rac et Cdc42), aussi bien *in vitro* (Goehring *et al.*, 1999) qu'*in vivo* (Krall *et al.*, 2002). Cette activité Rho GAP réside dans la région N-terminale de ExoS, entre les résidus 96 et 232 (Pederson *et al.*, 2002). Les protéines Rho sont impliquées dans le maintien du cytosquelette d'actine (Nobes et Hall, 1995a; Nobes et Hall, 1995b). L'activité GAP de ExoS va donc stimuler une réorganisation du cytosquelette d'actine via l'inhibition de Rac et Cdc42, et induire la disparition des fibres de tension qui sont constituées d'actine, via l'inhibition de Rho (Krall *et al.*, 2002). Ceci provoque l'inactivation de processus cellulaires, comme la mobilité et la phagocytose (Hall et Nobes, 2000).

D'autre part, la région C-terminale de ExoS possède, *in vitro* et *in vivo*, une activité catalytique d'ADP-ribosylation des protéines de la famille Ras (Ganesan *et al.*, 1998; Ganesan *et al.*, 1999b; Henriksson *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 1999). L'activité ADP-ribosyltransférase requiert la présence d'une protéine eucaryote, la protéine FAS (Facteur Activant l'exoenzyme S), qui appartient à la famille des protéines 14-3-3 (Coburn *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1993; Ganesan *et al.*, 1998; Henriksson *et al.*, 2002). Le site d'interaction de la protéine FAS est localisé dans les 27 derniers acides aminés de ExoS (Pederson *et al.*, 2002). L'activité d'ADP-ribosylation repose sur deux résidus d'acide glutamique: un résidu catalytique en E381 et un résidu en E379 qui participe au transfert du ribose sur la protéine cible (Liu *et al.*, 1996; Radke *et al.*, 1999). ExoS ADP-ribosyle Ras au niveau des résidus Arg-41 et Arg-128. L'ADP-ribosylation au niveau du résidu Arg-41 inhibe la liaison de Ras au facteur d'échange du nucléotide guanine (GEF), ce qui maintient la protéine Ras dans une conformation inactive (Ganesan *et al.*, 1999a) et inhibe donc la voie de signalisation Ras. Cette dernière joue un rôle central dans la prolifération et la différenciation cellulaires, dans le processus apoptotique, ainsi que dans le transport des vésicules intracellulaires (Bourne *et al.*, 1990). L'inhibition de ces différents processus, via l'inactivation de Ras, fait de l'exotoxine S un facteur de virulence essentiel au développement des infections chroniques à *P. aeruginosa*.

De plus, l'exoenzyme S sécrétée dans le milieu extracellulaire contribue à l'inflammation observée lors des infections à *P. aeruginosa*. En effet, l'interaction de ExoS avec le TLR2 et/ou le complexe TLR4/MD-2/CD14 induit une stimulation des monocytes qui vont alors produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Epelman *et al.*, 2000; Epelman *et al.*, 2002; Epelman *et al.*, 2004). Enfin, l'interaction directe de cette exoenzyme avec les lymphocytes T entraîne une activation de ces cellules qui en réponse prolifèrent et entrent en apoptose (Bruno *et al.*, 1998; Bruno *et al.*, 2000; Mody *et al.*, 1995).

#### **2.E.4.2- L'exoenzyme T**

Comme l'exoenzyme S, l'exoenzyme T est une protéine bifonctionnelle de 53 kDa. Les alignements de séquence révèlent une identité de 75% au niveau des acides aminés entre ExoS et ExoT. *In vitro*, ExoT possède une activité GAP spécifique de la GTPase RhoA. Cependant, contrairement à ExoS, l'activité catalytique d'ADP-ribosylation FAS-dépendante de ExoT n'est pas spécifique *in vitro* de Ras mais des protéines CrkI et II (Li *et al.*, 1997; Sun et Barbieri, 2003; Sundin *et al.*, 2001). L'activité ADP-ribosyltransférase de ExoT ne représente que 0,2 à 1% de celle de ExoS (Yahr *et al.*, 1996). Ceci s'expliquerait par la délétion d'un ou plusieurs acides aminés nécessaires à l'expression optimale de l'activité ADP-ribosylation (Li *et al.*, 1997). Les travaux de Vallis *et al.* indiquent que l'activité enzymatique de ExoT, comme celle de ExoS, provoque un changement de morphologie des cellules infectées (Vallis *et al.*, 1999).

#### **2.E.4.3- L'exoenzyme U**

L'exoenzyme U est une protéine de 74 kDa. C'est la plus grande des quatre cytotoxines sécrétées par le SSTT de *P. aeruginosa*. Le gène *exoU* est organisé en opéron avec le gène *spcU*, codant pour la protéine chaperone de ExoU (Finck-Barbancon *et al.*, 1997). Récemment Sato *et al.* (2003) ont montré que ExoU possède une activité phospholipase A<sub>2</sub>, ce qui en fait la première lipase sécrétée par le SSTT. L'activation de l'activité lipase de ExoU requiert un ou plusieurs facteurs eucaryotes, encore inconnus (Sato *et al.*, 2003).

La large spécificité de substrats de cette lipase lui permet de dégrader les composants de la membrane cytoplasmique ainsi que des membranes internes, entraînant une mort nécrotique des cellules eucaryotes (Sato *et al.*, 2003). De plus, l'activité lipolytique de ExoU

envers l'un des principaux surfactants pulmonaires, le dipalmitoyl phosphatidylcholine, pourrait contribuer à la dissémination rapide des souches bactériennes exprimant ExoU du tissu pulmonaire au système sanguin (Allewelt *et al.*, 2000).

#### **2.E.4.4- L'exoenzyme Y**

Cette cytotoxine est une adénylate cyclase de 48 kDa (Yahr *et al.*, 1998). L'analyse des séquences a permis de montrer que ExoY présente des homologies avec les adénylates cyclases CyaA de *Bordetella pertusis* et EF de *Bacillus anthracis* (Yahr *et al.*, 1998). La translocation d'ExoY dans les cellules cibles provoque une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc (Yahr *et al.*, 1998), induisant un changement de morphologie de ces cellules qui deviennent arrondies (Vallis *et al.*, 1999). L'activation de l'activité adénylate cyclase de ExoY nécessite un ou des facteurs inconnus de la cellule eucaryote (Yahr *et al.*, 1998).

#### **2.E.5- La régulation du SSTT de *P. aeruginosa***

Les pathogènes ont développé différentes stratégies pour contrôler l'expression du SSTT (Francis *et al.*, 2002). Certaines bactéries, comme *Salmonella* et *Shigella*, accumulent les effecteurs dans la cellule avant le contact avec la cellule cible. D'autres pathogènes, comme *P. aeruginosa* et *Yersinia*, synthétisent fortement les effecteurs de type III à la suite d'un contact avec les cellules eucaryotes cibles. Une signalisation contact-dépendante est alors indispensable *in vivo* pour induire l'expression du SSTT et la sécrétion des protéines effectrices. *In vitro*, l'induction peut être mimée par la déplétion en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture mais aussi par des modifications de l'osmolarité ou encore de la température (Iglewski *et al.*, 1978; Vallis *et al.*, 1999). Les mécanismes de détection et de transduction de ces signaux environnementaux ne sont pas encore bien connus.

Chez *P. aeruginosa*, l'expression de l'ensemble des gènes codant pour le SSTT et des effecteurs, est régulée au niveau transcriptionnel par l'activateur transcriptionnel ExsA qui est codé par l'opéron *trans*-régulateur *exsCBA* (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Frank, 1997; Frank et Iglewski, 1991; Hovey et Frank, 1995; Yahr et Frank, 1994; Yahr *et al.*, 1996). ExsA appartient à la famille des activateurs transcriptionnels de type AraC qui comportent un motif C-terminal de fixation à l'ADN en hélice-tour-hélice. Ainsi, ExsA se lie à une séquence

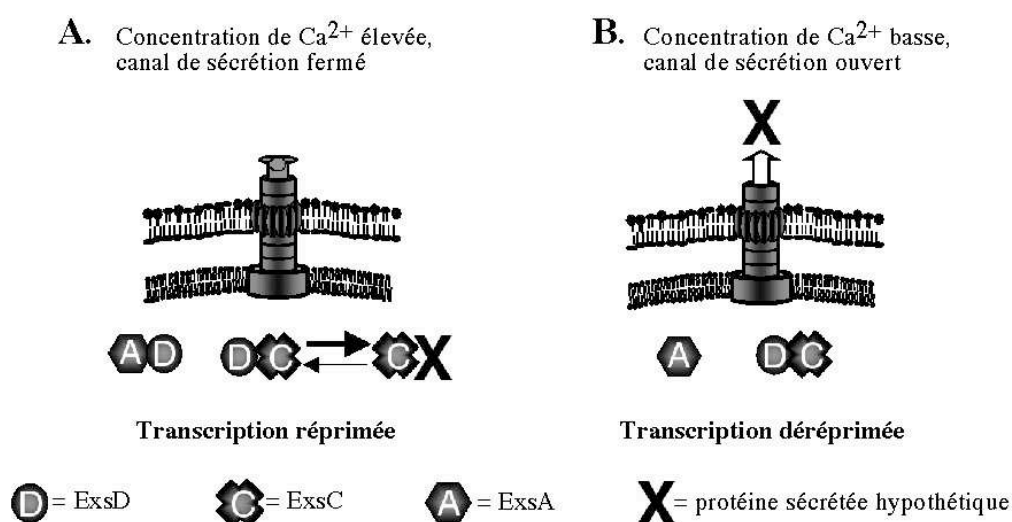
consensus (TNAAAANA) située approximativement à une cinquantaine de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription des gènes du SSTT (Hovey et Frank, 1995; Yahr et Frank, 1994; Yahr *et al.*, 1995). La mutation du gène *exsA* réprime l'expression de tous les gènes codant pour le SSTT, ce qui signifie que ExsA est le régulateur transcriptionnel central du SSTT de *P. aeruginosa* (Hovey et Frank, 1995; Yahr et Frank, 1994).

Un modèle d'une voie de régulation, basé sur le couplage de la transcription des gènes du SSTT à la sécrétion de type III, a été proposé par Dasgupta *et al.* (2004) (figure I.11). Ce mécanisme implique ExsA et au moins trois autres protéines:

- un anti-activateur non sécrété appelé ExsD, qui est capable d'interagir avec ExsA afin de le séquestrer (McCaw *et al.*, 2002).

- un anti-anti-activateur appelé ExsC qui interagit avec l'anti-activateur ExsD (Dasgupta *et al.*, 2004). ExsC présente les caractéristiques biochimiques typiques des protéines chaperones du SSTT, un bas poids moléculaire (16,3 kDa), un point isoélectrique acide (4,6) et une hélice- $\alpha$  putative en C-terminale (Feldman et Cornelis, 2003; Page et Parsot, 2002).

- Une protéine sécrétée encore inconnue, appelée protéine X.



**Figure I.11.** Représentation schématique du modèle de régulation du SSTT de *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2004).

Dans ce modèle, lorsque le canal de sécrétion est fermé (figure I.11A), la protéine X resterait dans le cytosol et séquestrerait ExsC. ExsD serait alors libre pour interagir avec ExsA, ce qui réprimerait la transcription des gènes du SSTT. L'ouverture du canal de sécrétion (figure I.11B) entraînerait la sécrétion de la protéine X, libérant ainsi ExsC dans le cytosol bactérien. ExsC libre pourrait alors interagir avec ExsD, ce qui libérerait l'activateur transcriptionnel ExsA. Il s'ensuit la transcription ExsA-dépendante des gènes codant pour le SSTT. La validation de ce modèle nécessite de déterminer cette protéine sécrétée X.

Ce schéma de régulation basé sur un couplage «transcription/sécrétion» est commun à de nombreux SSTT ainsi qu'au système de biosynthèse du flagelle (Miller, 2002). Toutefois, les mécanismes de couplage «transcription/sécrétion» présentent des différences selon les SSTT. Par exemple, chez *S. typhimurium* et *S. flexneri*, l'expression du régulon de type III requiert une interaction entre un activateur transcriptionnel de la famille des activateurs transcriptionnels de type AraC (InvF et MxiE respectivement) et un co-activateur (SicA et IpgC) (Darwin et Miller, 2001; Mavris *et al.*, 2002a). Ces co-activateurs sont les chaperones des protéines translocatrices sécrétées par le SSTT. Lorsque le canal de sécrétion est fermé, SicA et IpgC sont liées à leurs substrats de chaperone et ne peuvent donc pas agir comme co-activateur de InvF et de MxiE. L'ouverture du canal et la sécrétion des substrats de SicA et IpgC entraînent la libération de ces chaperones qui peuvent alors agir comme co-activateurs des facteurs de transcription InvF et MxiE et ainsi activer l'expression du régulon de type III (Darwin et Miller, 2001; Mavris *et al.*, 2002a).

Cependant, on ne sait toujours pas comment est déclenchée la sécrétion. De récentes études montrent que la régulation de l'expression du SSTT de *P. aeruginosa* est très complexe puisqu'elle intègre de nombreuses protéines produites en réponse à différents stimuli

- Le régulateur de réponse hybride avec une kinase senseur, RtsM (Regulator of Type III Secretion), qui est ancré dans la membrane bactérienne interne, est essentiel à l'expression des gènes codant pour le SSTT induite par la déplétion de  $Ca^{2+}$  ou par le contact avec la cellule hôte (Laskowski *et al.*, 2004). RtsM ne possède pas de motif de liaison à l'ADN, ce qui suggère qu'il régule indirectement la transcription de ces gènes (Laskowski *et al.*, 2004).

- Le régulateur de réponse hybride avec une kinase senseur, RetS (Regulator of Type III Secretion) est requis pour l'expression des gènes du SSTT et d'autres facteurs de

virulence, ainsi que pour la répression des gènes codant pour les exopolysaccharides composant le biofilm (Goodman *et al.*, 2004).

- Le système de quorum-sensing RhII/RhIR et le facteur sigma RpoS, exprimé en phase de stationnaire de croissance, régulent négativement l'expression de ExoS. Le mécanisme de régulation n'est pas encore connu, mais cette régulation concorde avec la répression du SSTT lors de la croissance bactérienne en biofilm (Hogardt *et al.*, 2004).

- La balance métabolique de la bactérie influence l'expression des gènes du SSTT. En effet, il a été montré que le système de régulation à deux composants CbrA-CbrB, sensible au déséquilibre carbone/azote, affecte l'expression du SSTT (Rietsch *et al.*, 2004) et que les sous-unités AceA et AceB de la pyruvate déshydrogénase sont nécessaires à l'expression des gènes du SSTT (Dacheux *et al.*, 2002).

- Sous l'influence de certains signaux environnementaux, la protéine transmembranaire MucA va libérer dans le cytoplasme bactérien le facteur sigma AlgU. Ce dernier est requis pour l'expression des activateurs transcriptionnels AlgP, AlgQ, AlgB et AlgR qui contribuent à la synthèse des alginates. Cependant, d'un autre côté, AlgR va activer l'expression de gènes encore inconnus qui vont réprimer l'expression des gènes codant pour le SSTT via l'inactivation de ExsA (Wu *et al.*, 2004)

- La protéine PtrA (Pseudomonas type III repressor A) dont l'expression est induite par le cuivre en concentration élevée via le système de régulation à deux composants CopR-CopS, interagit avec ExsA et réprime ainsi l'expression des gènes codant pour le SSTT (Ha *et al.*, 2004).

Ainsi, le schéma de régulation de l'expression du SSTT intègre de nombreuses voies de régulation, chacune spécifique à un stimulus. Ces différentes voies de régulation s'interconnectent très probablement au niveau de l'activateur transcriptionnel ExsA, via des interactions entre ExsA et des protéines dont l'expression est induite spécifiquement par ces stimuli.

De plus, Wolfgang *et al.* ont montré que l'induction du SSTT par de faibles concentrations de  $Ca^{2+}$  ou par le contact avec la cellule hôte implique une cascade de signalisation AMP cyclique (AMPC) (Wolfgang *et al.*, 2003b). Ces deux stimuli induisent la production d'AMPC principalement par l'adénylate cyclase associée à la membrane CyaB, laquelle pourrait également être le senseur membranaire de ces deux stimuli, mais aussi dans un moindre degré par CyaA. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC active le facteur de transcription AMPC-dépendant Vfr, lequel entraîne via ExsA l'expression des gènes codant pour le SSTT (Wolfgang *et al.*, 2003b). Le mécanisme par lequel le

complexe AMPc:Vfr permet l'expression des gènes du SSTT n'est pas encore connu. Cette voie de signalisation AMPc est essentielle à l'expression des gènes codant pour le SSTT puisqu'un double mutant *cyaAB* est incapable de lyser des cellules CHO (Wolfgang *et al.*, 2003b). Par ailleurs, la cascade de signalisation AMPc-Vfr est une voie qui coordonne l'expression de gènes codant pour de nombreux facteurs de virulence comme le pili de type IV, le flagelle et le système de sécrétion de type II (Suh *et al.*, 2002; Wolfgang *et al.*, 2003b).

### 3. Le translocon de *P. aeruginosa*

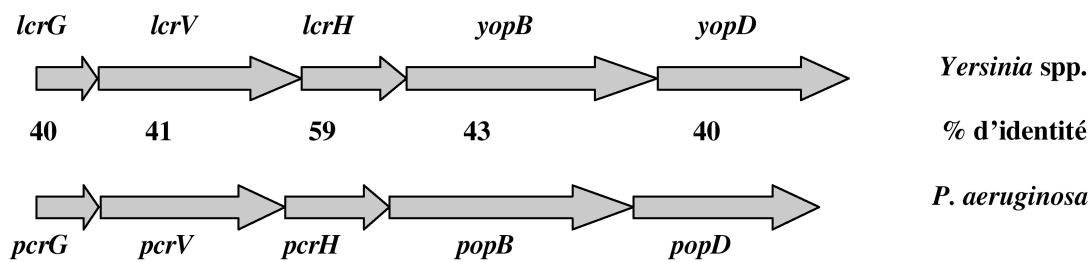
Il a été suggéré que le passage des effecteurs cytotoxiques à travers la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote est réalisé par un complexe protéique transmembranaire, appelé «translocon», lequel forme un canal dans la membrane de la cellule eucaryote.

Depuis le début de ma thèse (2001), de nombreuses études ont été réalisées et publiées sur les protéines essentielles à la formation du translocon du SSTT de différentes espèces bactériennes. Ces données ne sont volontairement pas reprises dans l'introduction, mais seront abordées au cours des différentes discussions.

#### 3.A- L'opéron de translocation

Le processus de translocation du SSTT de *Yersinia* spp. a fait l'objet de nombreuses études dans le début des années 90. Les travaux réalisés par les groupes de Cornelis et Wolf-Watz ont montré que l'inactivation des gènes *yopB*, *yopD* ou *lcrV* provoque une absence du processus de translocation des protéines effectrices dans le cytosol de la cellule eucaryote sans affecter la sécrétion des protéines du SSTT (Boland *et al.*, 1996; Rosqvist *et al.*, 1994; Sarker *et al.*, 1998a; Sory et Cornelis, 1994). Il a donc été suggéré que les protéines LcrV, YopB et YopD constituent l'appareil de translocation du SSTT de *Yersinia* spp. (Cornelis et Wolf-Watz, 1997; Sarker *et al.*, 1998a).

Ces trois protéines sont codées par l'opéron polycistronique *lcrGVH-yopBD*, appelé opéron de translocation (Hakansson *et al.*, 1993). En 1997, un opéron homologue, possédant la même organisation génétique, a été découvert chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de l'opéron *pcrGVH-popBD* (Yahr *et al.*, 1997) (figure I.12). L'homologie de séquence entre les protéines homologues codées par ces deux opérons varie entre 41 et 59%.



**Figure I.12. Représentation schématique des opérons de translocation de *Yersinia* (*lcrGVHyopBD*) et de *P. aeruginosa* (*pcrGVHpopBD*).**

Le pourcentage d'identité au niveau des acides aminés entre les différentes séquences protéiques est obtenu par alignement avec le programme Clustal W.

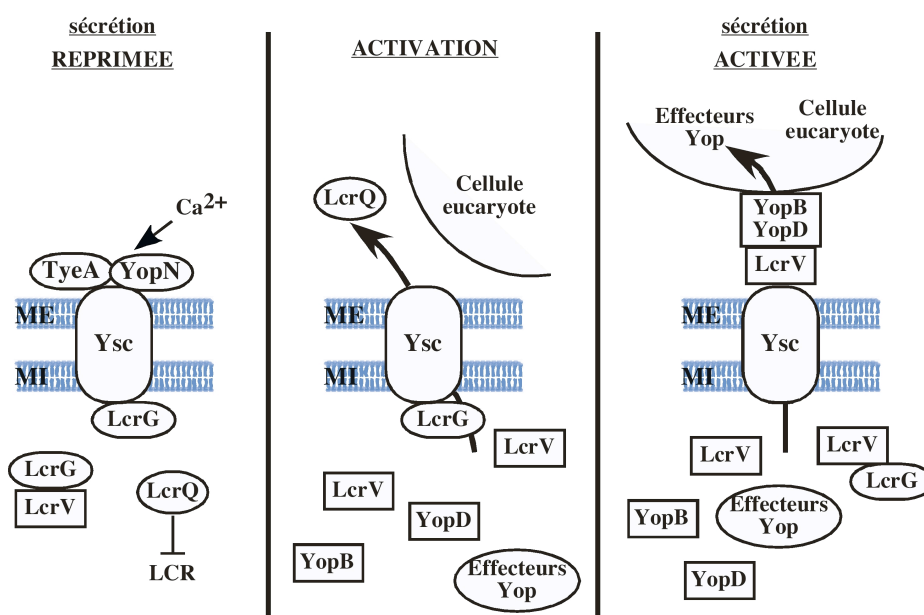
### 3.A.1- La protéine PcrG

PcrG est une petite protéine de 98 acides aminés qui a été très peu étudiée. Cette protéine est capable d'interagir avec PcrV afin de former un complexe d'une stoechiométrie de 1:1, qui permet de stabiliser PcrG dans le cytosol bactérien (Nanao *et al.*, 2003). L'affinité de l'interaction entre PcrV et PcrG est très élevée, environ 15 nM, ce qui suggère que ce complexe pourrait intervenir dans un mécanisme de régulation de la sécrétion de type III (Nanao *et al.*, 2003) mais que PcrG pourrait également être la chaperone de PcrV.

L'homologue de PcrG chez *Yersinia* ssp., LcrG (40% d'identité), est une protéine principalement cytoplasmique. Toutefois, elle est également présente en petite quantité dans le surnageant de culture et associée à la surface de la bactérie (Boyd *et al.*, 1998; Nilles *et al.*, 1998; Nilles *et al.*, 1997; Skrzypek et Straley, 1993).

Des expériences de mutagenèse ont permis d'attribuer à LcrG une fonction de régulateur négatif de la sécrétion de type III (Skrzypek et Straley, 1993; Skrzypek et Straley, 1995), fonction qui est contrôlée via l'interaction avec LcrV dans le cytosol bactérien (Nilles *et al.*, 1997; Sarker *et al.*, 1998a). En 2001, Matson et Nilles ont proposé un modèle de régulation de la sécrétion de type III de *Y. pestis* par titration de LcrG par LcrV (Figure I.13) (Matson et Nilles, 2001; Nilles *et al.*, 1998; Nilles *et al.*, 1997; Skrzypek et Straley, 1993).





**Figure I.13. Modèle de régulation de la sécrétion de type III chez *Y. pestis* par titration de *LcrG*** (adapté d'après Matson et Nilles, 2001).

ME, membrane externe; MI, membrane interne, LCR, Low-Calcium Response.

Dans des conditions non-inductrices (présence de  $\text{Ca}^{2+}$ ), le répresseur transcriptionnel LcrQ est présent dans le cytoplasme et réprime l'expression de *lcrV* et des autres gènes codant pour des protéines sécrétées par le SSTT. Le canal de sécrétion est bouché par LcrG du côté cytoplasmique et par YopN et TyeA à son extrémité distale. L'absence de calcium ou le contact avec la cellule eucaryote entraînent le détachement des protéines qui forment le bouchon à la surface de la bactérie. Le répresseur LcrQ est alors sécrété ce qui induit l'expression de tous les gènes du SSTT sensible à la déplétion de calcium (LCR, Low-Calcium Response), dont *lcrV*, *yopB*, *yopD* et tous les effecteurs (activation de la sécrétion). L'augmentation de la quantité de LcrV cytoplasmique va permettre de titrer LcrG et donc de libérer totalement le canal de sécrétion. La sécrétion est donc «activée» ce qui permet une forte expression des gènes codant pour le SSTT et la translocation des effecteurs Yop dans la cellule eucaryote cible.

Ces mêmes auteurs ont montré que PcrG complète fonctionnellement le mutant *lcrG* (Matson et Nilles, 2001; Matson et Nilles, 2002). Toutefois, il est très improbable que ce modèle de régulation par titration puisse être appliqué à *P. aeruginosa*, car la délétion de *pcrG*, comme celle de *pcrV*, n'affecte pas la régulation de la sécrétion de type III par le calcium (Goure *et al.*, 2004; Sundin, 2003). La régulation de la sécrétion des protéines effectrices et translocatrices doit donc être différente dans ces deux pathogènes.

Par ailleurs, les expériences de mutagenèse de *lcrG* ont également permis de suggérer que LcrG est la protéine chaperone de LcrV, puisque la délétion de *lcrG* de *Y. enterocolitica* affecte uniquement la sécrétion de LcrV (DeBord *et al.*, 2001), et qu'elle est également impliquée dans le processus de translocation (Sarker *et al.*, 1998b). Cependant, cette dernière fonction de LcrG est controversée par une étude de DeBord *et al.* (2001). En effet, ces auteurs n'observent pas de variation significative de la quantité de protéines effectrices transloquées dans les cellules eucaryotes en absence de LcrG (DeBord *et al.*, 2001).

### 3.A.2- La protéine PcrH

PcrH est une petite protéine non sécrétée de 18,6 kDa, de pH isoélectrique acide. Au vue de ces caractéristiques biochimiques, PcrH a été très tôt prédite comme étant la chaperone des protéines translocatrices PopB et PopD (protéine chaperone de classe II) (Yahr *et al.*, 1997). PcrH exerce sa fonction de chaperone en interagissant directement avec les protéines PopB et PopD dans le cytosol bactérien (Allmond *et al.*, 2003; Bröms *et al.*, 2003b; Schoehn *et al.*, 2003). Cette interaction permet une sécrétion efficace des protéines translocatrices (Bröms *et al.*, 2003b) mais également de stabiliser ces protéines dans le cytosol bactérien, les protégeant ainsi de la dégradation et/ou d'une possible agrégation.

*In vitro*, il a été observé que la diminution du pH entraîne un relargage de PcrH des complexes PopB:PcrH et PopD:PcrH, ce qui permet aux protéines translocatrices de reconnaître et d'interagir avec les liposomes (Schoehn *et al.*, 2003). L'interaction de PcrH avec PopB et PopD pourrait donc permettre le maintien de ces protéines dans une conformation dite «membrane-inactive» et ainsi prévenir une activation précoce de ces protéines dans le cytoplasme bactérien, laquelle pourrait être très préjudiciable pour la bactérie (Schoehn *et al.*, 2003).

Une étude de Bröms *et al.* (2003) a montré d'une part que PcrH est capable d'interagir fortement avec YopD et d'autre part, qu'elle assure efficacement la sécrétion de cette protéine dans *Yersinia* (Bröms *et al.*, 2003b). *In vitro*, aucune association n'a été détectée entre YopB

et PcrH et entre PopB et LcrH (Bröms *et al.*, 2003b). Par ailleurs, contrairement à YopD, aucun domaine de liaison à LcrH n'a été identifié dans YopB (Neyt et Cornelis, 1999b). Ceci suggère que la structure tertiaire de YopB et de PopB pourrait restreindre la spécificité d'interaction de ces protéines à leur chaperone respective. Cette différence d'interaction de la chaperone de classe II avec ces deux substrats protéiques est également observée pour SicA avec SipB et SipC, et pour IpgC avec IpaB et IpaC (Hermant *et al.*, 1995; Osiecki *et al.*, 2001).

De plus, contrairement à ses homologues des chaperones de classe II, LcrH, SicA et IpgC, aucune fonction régulatrice n'a encore été attribuée à PcrH (Anderson *et al.*, 2002; Bröms *et al.*, 2003b; Cambronne et Schneewind, 2002; Francis *et al.*, 2001).

### 3.A.3- La protéine PcrV

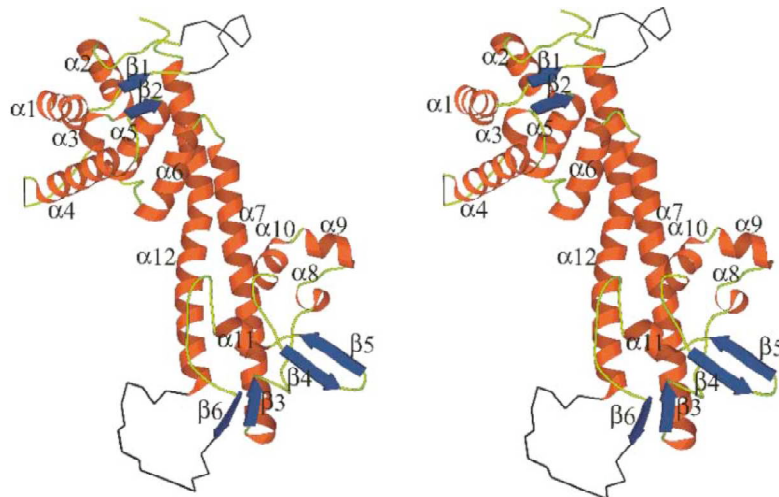
#### 3.A.3.1- PcrV et son homologue LcrV

La protéine PcrV, appelée antigène V, est une protéine soluble de 32,3 kDa dont l'homologue chez *Yersinia* spp., LcrV (41 % d'identité), a été identifié en 1956 comme étant l'antigène majeur de la virulence de *Y. pestis* (Burrows, 1956). Depuis 1956, cette protéine a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mettre en évidence sa multifonctionnalité.

Outre son rôle de régulateur de la sécrétion de type III dans le cytosol bactérien, via la formation de complexes LcrV-LcrG (Matson et Nilles, 2001), la protéine LcrV qui est exposée à la surface de la bactérie est essentielle au processus de translocation (Bröms *et al.*, 2003c; Lee *et al.*, 2000; Pettersson *et al.*, 1999).

Toutefois, la fonction de LcrV dans le mécanisme de translocation est très controversée. En effet, des travaux réalisés dans le laboratoire du Dr. Cornelis ont montré que LcrV n'était pas associée aux membranes de liposomes infectés par *Y. enterocolitica* (Tardy *et al.*, 1999) et qu'*in vitro* cette protéine interagissait avec les deux protéines translocatrices YopB et YopD (Sarker *et al.*, 1998a). Ces auteurs ont donc suggéré que LcrV intervenait dans le mécanisme d'assemblage du pore de translocation YopB/D mais pas dans la composition de ce pore. Cependant en 2001, Holmström *et al.* ont proposé que LcrV constituait la partie membranaire du translocon insérée dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote (Holmström *et al.*, 2001). Ces auteurs ont démontré que LcrV possédait une activité formatrice de pores et qu'elle était l'élément déterminant la taille du pore de translocation. On pensait que l'obtention de la structure de LcrV aurait permis d'éclaircir la ou les fonctions de

cette protéine dans le processus de translocation, malheureusement la résolution de la structure de LcrV de *Y. pestis* à 2,2 Å n'a pas permis d'établir de relations structure-fonction (Derewenda *et al.*, 2004). On observe sur la figure I.14 une structure de LcrV en forme d'haltère, avec deux domaines globulaires reliés par deux hélices- $\alpha$  anti-parallèles, lesquelles forment un domaine «*coiled-coil*» intramoléculaire.



**Figure I.14. Structure tertiaire de LcrV de *Y. pestis*** (Derewenda *et al.*, 2004).

Structure tertiaire de la protéine LcrV, avec les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  colorés respectivement en rouge et bleu.

Par ailleurs, l'antigène V des trois espèces de *Yersinia* pathogène pour l'homme (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*) possède une propriété anti-inflammatoire. Cette dernière est très importante pour la pathogénicité de ces espèces puisqu'elle permet à *Yersinia* de détourner la réponse immunitaire innée afin d'échapper à la réponse immune de l'hôte. En effet, la région N-terminale de LcrV contient un motif VLEELVQLVKDKKIDISIK reconnu par le TLR2 et le CD14 (Sing *et al.*, 2002). Ainsi, l'interaction de la protéine LcrV sécrétée avec les macrophages induit la production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) et inhibe la production du facteur- $\alpha$  de nécrose des tumeurs (TNF- $\alpha$ ) et de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (cytokines pro-inflammatoires) (Nakajima *et al.*, 1995; Nedialkov *et al.*, 1997; Sing *et al.*, 2002). De plus, la protéine LcrV inhibe la migration chimiotactique des neutrophiles (Welkos *et al.*, 1998). Cette fonction immuno-modulatrice n'est pas retrouvée dans l'antigène V de *P. aeruginosa* (Sing *et al.*, 2002), ce qui pourrait

expliquer pourquoi *Yersinia* spp. est une bactérie pathogène et *P. aeruginosa* un microorganisme pathogène opportuniste (Sawa *et al.*, 1997). Cependant, cette différence n'affecte pas la capacité de la protéine PcrV à compléter *in vitro* la translocation des protéines Yops dans un mutant *lcrV* de *Y. pseudotuberculosis* (Pettersson *et al.*, 1999).

Chez *Y. pestis*, la protéine LcrV est également transloquée dans le cytosol des cellules eucaryotes infectées par une voie de sécrétion indépendante du SSTT, appelée VCAT (LcrV-transporting contact-activated translocator) (Fields et Straley, 1999). Cependant, aucune fonction dans le cytoplasme de la cellule eucaryote n'a pu être attribuée à LcrV (Fields et Straley, 1999).

### 3.A.3.2- PcrV, un candidat pour la vaccination

Il y a maintenant près d'une cinquantaine d'années qu'ont été découvertes les caractéristiques antigéniques de l'antigène V de *Y. pestis* (LcrV) à induire chez les souris une protection immune contre la peste (Burrows, 1956; Burrows et Bacon, 1958). Depuis cette découverte, de nombreuses études ont été entreprises pour développer l'immunothérapie contre LcrV afin de se protéger contre le bioterrorisme, puisque *Y. pestis* est classée dans la catégorie A des pathogènes utilisés pour la construction d'armes bactériologiques (Lawton et Surgalla, 1963, NIAID, 2002 #410). L'injection d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de LcrV protègent les animaux d'infection létales à *Y. pestis* (Motin *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1991; Une et Brubaker, 1984), via l'inhibition du processus de translocation des effecteurs cytotoxiques (Pettersson *et al.*, 1999) et de la propriété anti-inflammatoire de LcrV (Sawa et Wiener-Kronish, 2004).

Afin de lutter contre l'émergence de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques, le développement de thérapies complémentaires, comme l'immunothérapie, est devenu très important. Par analogie avec LcrV de *Y. pestis*, l'antigène V de *P. aeruginosa* a été sélectionné comme candidat pour l'immunisation de souris contre les infections à *P. aeruginosa*. En 1999, Sawa *et al.* ont montré que les immunisations active et passive contre PcrV augmentent de façon significative la survie des souris infectées par des doses létales de *P. aeruginosa*. Ces anticorps protecteurs provoquent une inhibition de la translocation des cytotoxines dans les cellules eucaryotes. Cette inhibition se traduit par une suppression de l'effet antiphagocytaire de *P. aeruginosa* ainsi qu'une diminution des lésions et de l'inflammation au niveau pulmonaire (Sawa *et al.*, 1999; Shime *et al.*, 2001). L'épitope protecteur de PcrV qui est compris entre les résidus 144 et 257 (Frank *et al.*, 2002) se

superpose avec celui de LcrV (résidus 135 à 275) (Hill *et al.*, 1997). Le pathogène *Y. pestis* et le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* utilisent donc une stratégie commune, associée à leurs antigènes V homologues, pour infecter les cellules notamment au niveau des poumons (Sawa et Wiener-Kronish, 2004).

Toutefois, on ne sait pas comment l'interaction entre les anticorps protecteurs et les antigènes V inhibe la cytotoxicité de *P. aeruginosa* et de *Y. pestis* envers les cellules eucaryotes. Il a été établi que la capacité de protection de ces anticorps est indépendante de leur fragment Fc (Frank *et al.*, 2002) et que ces anticorps ne provoquent ni une agglutination, ni une augmentation de la lyse de *P. aeruginosa* par le complément. L'étude des effets de ces anticorps sur le complexe de translocation pourrait aider à clarifier le(s) fonction(s) de l'antigène V dans le processus de translocation. Ainsi, j'ai étudié au cours de ma thèse les effets de ces anticorps protecteurs sur l'assemblage du translocon du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Y. pestis* (Chapitre V).

### 3.A.4- Les protéines translocatrices PopB et PopD

#### 3.A.4.1- La protéine PopB

PopB est une protéine sécrétée de 40,3 kDa, essentielle à la cytotoxicité type III-dépendante de *P. aeruginosa* envers les cellules épithéliales (Hauser *et al.*, 1998). L'analyse de la structure secondaire de PopB révèle la présence de deux domaines transmembranaires entre les résidus 170-188 et 232-250, ainsi que d'un domaine d'interaction protéine-protéine entre les résidus 331-375 (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998; Hauser *et al.*, 1998) (figure III.12). Ces domaines sont conservés dans la protéine homologue de *Yersinia* spp. appelée YopB (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998) (figure III.12), qui est décrite comme une protéine essentielle à la translocation des effecteurs dans la cellule eucaryote ainsi qu'à l'activité hémolytique de *Yersinia* (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998; Hakansson *et al.*, 1996). En effet, la protéine YopB purifiée induit la formation de canaux dans une bicouche lipidique artificielle (Hakansson *et al.*, 1996) et est insérée dans les membranes de liposomes lors de l'infection par *Yersinia* (Tardy *et al.*, 1999).

Récemment Viboud *et al.* (2003) ont montré que YopB était capable de stimuler la voie de signalisation pro-inflammatoire des cellules épithéliales HeLa (production d'IL- $\alpha$ ), via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Cette propriété pro-inflammatoire de YopB

pourrait être médiée par un récepteur présent à la surface des cellules épithéliales puisqu'elle ne nécessite pas la formation de pore de translocation. Néanmoins, la translocation des effecteurs YopH, YopE et YopJ dans le cytoplasme eucaryote neutralise cette propriété de YopB (Viboud *et al.*, 2003).

### 3.A.4.2- La protéine PopD

La protéine PopD est une protéine sécrétée de 31,3 kDa qui est également requise pour la cytotoxicité type III-dépendante de *P. aeruginosa* envers les cellules épithéliales (Hauser *et al.*, 1998). L'analyse bio-informatique de la séquence protéique de PopD prédit un domaine transmembranaire entre les résidus 119-137 et une hélice amphiphile dans son extrémité C-terminale entre les résidus 267-281 (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998; Hauser *et al.*, 1998) (figure III.13). Une organisation structurale similaire est retrouvée dans son homologue chez *Yersinia* spp., appelé YopD (40 % d'identité) (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998).

La protéine YopD est indispensable au processus de translocation du SSTT ainsi qu'à la lyse des globules rouges (Holmström *et al.*, 2001; Neyt et Cornelis, 1999a; Tardy *et al.*, 1999). Son domaine hydrophobe (résidus 124 à 146) est essentiel à sa fonction dans l'activité hémolytique type III-dépendante de *Yersinia* spp. (Neyt et Cornelis, 1999a).

De plus, YopD est capable d'interagir *in vitro* avec l'effecteur YopE (Hartland et Robins-Browne, 1998) et de la même façon que cet effecteur, elle est transloquée dans le cytosol de cellules HeLa infectées où aucune fonction effectrice ne lui a été attribuée (Francis et Wolf-Watz, 1998). YopD pourrait donc être un élément dynamique du canal de translocation, qui intervient dans deux étapes distinctes du processus de translocation. YopD participerait dans un premier temps à la formation du pore de translocation dans la membrane de la cellule eucaryote, puis elle se comporterait comme une chaperone qui maintient les protéines effectrices dans un état compétent pour leur micro-injection tout en les conduisant dans le cytosol des cellules eucaryotes cibles (Holmström *et al.*, 2001; Neyt et Cornelis, 1999a).

Il a été montré que la *trans*-complémentation d'un mutant *yopD* par des constructions plasmidiques portant les gènes *popD* ou *pcrHpopD* ne permettait pas de restaurer la translocation des effecteurs Yops dans le cytosol des cellules HeLa (Bröms *et al.*, 2003a). Ce résultat suggère que malgré un pourcentage de similarité élevé (59% et 40 % d'identité) et une analogie fonctionnelle, les protéines YopD et PopD ne jouent pas exactement les mêmes fonctions dans le processus de translocation. Il est probable que pour exercer leur fonction de

translocateur, PopD et YopD requièrent des interactions avec des protéines spécifiques à leur SSTT. De plus, il n'a encore jamais été montré que la protéine PopD est transloquée dans le cytosol des cellules épithéliales infectées. Or, cette propriété de YopD est peut être essentielle à la translocation des effecteurs chez *Yersinia* spp.

De plus, la protéine YopD intervient également dans la régulation négative de l'expression des protéines Yops (Anderson *et al.*, 2002; Williams et Straley, 1998).

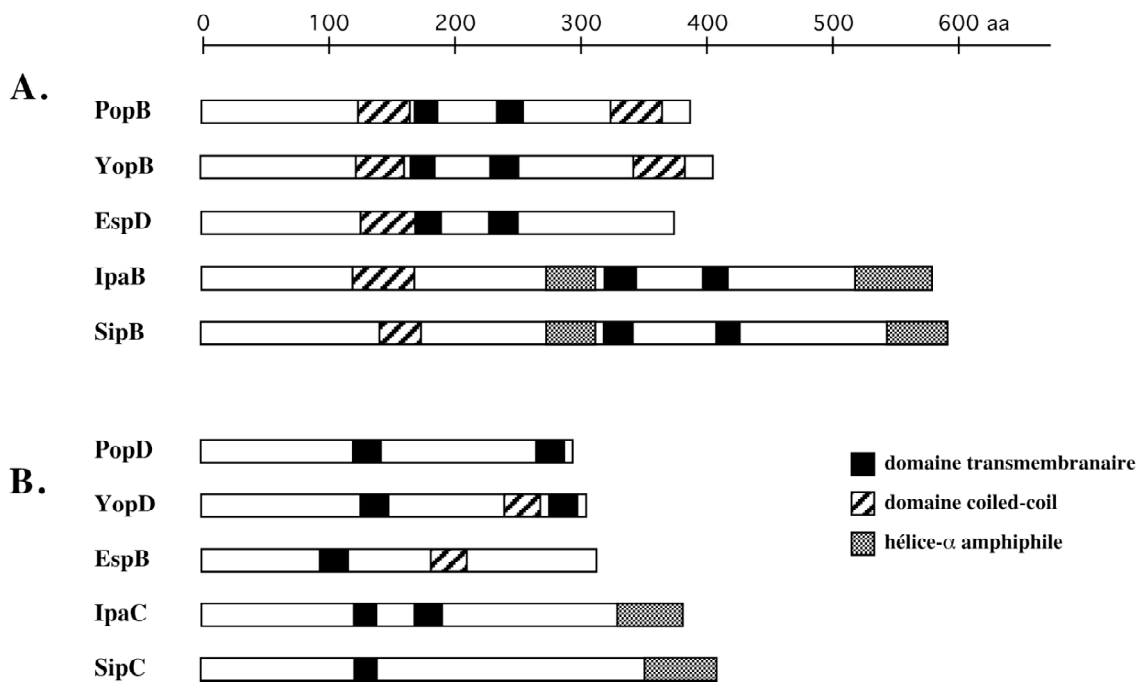
### 3.B- Homologues des protéines translocatrices dans les autres SSTT

Les protéines impliquées dans la formation du pore de translocation des SSTT de *S. flexneri*, d'EPEC et de *Salmonella* spp. (SPI-1) font l'objet de nombreuses études. Contrairement à l'antigène V, les protéines translocatrices PopB et PopD possèdent des homologues fonctionnels dans chacun de ces SSTT (figure I.15).

L'analyse bio-informatique de la structure secondaire des protéines homologues de PopB prédit que ces protéines possèdent deux domaines transmembranaires dans leur région centrale et au moins un domaine d'interaction protéine-protéine de type «*coiled-coil*» (figure I.15A), alors que les protéines homologues de PopD ont une organisation structurale moins conservée (figure I.15B).

Les couples de protéines translocatrices EspD/EspB, IpaB/IpaC ou SipB/SipC sont insérées dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes cibles infectées respectivement par EPEC (Wachter *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1998), *S. flexneri* (Blocker *et al.*, 1999) ou *Salmonella* spp. (Scherer *et al.*, 2000). Ces différentes protéines possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine de types «*coiled-coil*» et/ou «*hélice- $\alpha$  amphiphile*» qui sont connus pour être impliqués dans la formation de complexes homo- ou hétéro-oligomériques (Lupas, 1996). Ces données suggèrent que le translocon du SSTT est un complexe hétéro-oligomérique des deux protéines translocatrices. Toutefois, le processus de translocation des SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. requiert l'antigène V, lequel ne possède pas d'homologue chez EPEC, *S. flexneri* et *Salmonella* spp. Les translocons du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. pourraient donc avoir une composition différente.





**Figure 1.15.** Organisation structurale des protéines homologues de PopB (A.) et de PopD (B.) dans le SSTT de *Yersinia* spp. (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998), de *S. flexneri* (Hume *et al.*, 2003), d'EPEC (Wachter *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1998) et de *Salmonella* spp. (SPI-1) (Hayward *et al.*, 2000; Scherer *et al.*, 2000).

Par ailleurs, certaines de ces protéines possèdent d'autres fonctions que leur activité de translocateur comme la protéine IpaB qui est capable d'activer l'apoptose des macrophages (Chen *et al.*, 1996). En effet, l'association de IpaB avec la caspase-1, dans le cytoplasme du macrophage, active cette protéase à cystéine pro-apoptotique et pro-inflammatoire, ce qui aboutit à une mort par apoptose des macrophages (Dinarello, 1998; Guichon *et al.*, 2001; Hilbi *et al.*, 1997; Zychlinsky *et al.*, 1994). La seconde protéine translocatrice de *S. flexneri*, IpaC, est capable d'induire des réarrangements du cytosquelette d'actine de la cellule eucaryote hôte, via une probable interaction entre sa région C-terminale et Cdc42. Ceci initie l'internalisation de la bactérie par cette cellule (Kuelzo *et al.*, 2003; Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). Il a été proposé un rôle similaire à SipC qui est également capable d'interagir avec l'actine (Hayward et Koronakis, 1999). Les protéines homologues IpaB et SipB sont capables de s'insérer dans les membranes lipidiques sans altérer leur intégrité (De Geyter *et al.*, 2000; Hayward *et al.*, 2000; McGhie *et al.*, 2002). Ces deux protéines possèdent *in vitro* une activité de fusion des liposomes (Hayward *et al.*, 2000; Hume *et al.*, 2003) qui est intimement liée à l'entrée de la bactérie dans la cellule eucaryote (Hayward *et al.*, 2002).

## Les objectifs du travail de thèse

Les travaux réalisés par Denis Dacheux au cours de sa thèse (1997-2000) dans le laboratoire ont montré que l'effet cytotoxique de l'isolat clinique CHA de *P. aeruginosa* envers les cellules eucaryotes (polymorphonucléaires neutrophiles et les macrophages) est dépendant du système de sécrétion de type III, et notamment de l'opéron de translocation (Dacheux *et al.*, 1999; Dacheux *et al.*, 2000). Ce SSTT induit une mort cellulaire de type oncotique qui est associée à l'apparition de pores dans les membranes de ces cellules eucaryotes (Dacheux *et al.*, 2001b). L'étude de la composition et de l'assemblage de ces pores a été le projet de ma thèse.

Dans un premier temps, j'ai développé un modèle d'interaction cellulaire entre *P. aeruginosa* et des globules rouges de moutons (GRM). Ce modèle m'a permis de mettre en évidence chez *P. aeruginosa* une activité hémolytique dépendante du SSTT liée à la formation de pores dans les membranes des GRM. L'activité hémolytique est inhibée dans un mutant déficient pour les trois protéines, PcrV, PopB et PopD. Afin d'étudier la participation de chacune de ces trois protéines dans la formation des pores, j'ai construit trois souches isogéniques de CHA, chacune déficiente pour l'une des trois protéines, PcrV, PopB ou PopD. Par ailleurs, des analyses phénotypiques du mutant *pcrV* ont révélé que PcrV n'intervient ni dans la régulation transcriptionnelle du SSTT ni dans la régulation de l'induction de la sécrétion par le calcium.

La sécrétion des trois protéines, PcrV, PopB et PopD étant essentielle à l'activité formatrice de pore, j'ai recherché la présence de ces protéines dans les membranes de GRM infectés par les différentes souches mutantes. Les protéines PopB et PopD, comme leurs homologues fonctionnels dans les autres SSTT, sont insérées dans les membranes des cellules eucaryotes. Par contre, la protéine PcrV, qui est un composant clé du SSTT de *P. aeruginosa*, n'est pas retrouvée dans les membranes de GRM infectés par CHA. Cependant, elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage du pore de translocation PopB/D.

Dans une troisième partie (chapitre V), l'utilisation du modèle cellulaire *ex vivo* érythrocytes/*P. aeruginosa* m'a permis d'étudier le pouvoir protecteur des anticorps anti-PcrV contre les infections à *P. aeruginosa*. La réalisation d'expériences de fractionnement membranaire sur des GRM infectés par CHA en présence d'anticorps protecteur m'a permis d'étudier l'effet de ces anticorps sur l'assemblage du pore de translocation et d'établir ainsi une nouvelle conception du mécanisme d'action de ces anticorps protecteurs. Par ailleurs, en

collaboration avec Petr Broz, doctorant dans le laboratoire de G. Cornelis (Biozentrum, Bâle, Suisse), nous avons utilisé les GRM comme modèle cellulaire afin d'étudier la composition et l'incorporation du pore de translocation du SSTT de *Y. enterocolitica* dans les membranes d'hématies.

## CHAPITRE II

# MATÉRIELS ET MÉTHODES



# 1- Bactéries et plasmides

## 1.A- Répertoire des bactéries et plasmides utilisés (Tableau II.1)

Souches ou plasmides	Génotypes /phénotypes /commentaires	Sources ou références
<b>Souches</b>		
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	Novagen
DH5α	<i>endAI hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> FΔ( <i>argF-lacZYA</i> )U169 φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 λ <sup>-</sup>	Gibco BRL
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Souche sauvage de référence	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
CHA	Souche mucœide isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose	C.H.U de Grenoble, (Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
CHA-D1	CHA <i>exsA::Gm</i>	(Dacheux <i>et al.</i> , 1999)
CHAp <i>crV</i>	Insertion du Tn5Tc dans <i>pcrV</i>	(Dacheux <i>et al.</i> , 2001b)
CHAΔ <i>popBD</i>	CHA <i>popBA</i> <sub>38-391</sub> <i>popDA</i> <sub>1-293</sub> , insertion d'une cassette Gm	ce travail
CHAΔ <i>pcrV</i>	CHA <i>pcrVA</i> <sub>128-379</sub>	ce travail
PAO1Δ <i>pcrV</i>	PAO1 <i>pcrVA</i> <sub>128-379</sub>	ce travail
<i>Y. enterocolitica</i>		
E40	Souche sauvage portant le plasmide pYV40	
ΔHOPEMN	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub>	(Neyt et Cornelis, 1999a)
ΔHOPEMNB	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>yopB</i> Δ <sub>89-217</sub>	(Neyt et Cornelis, 1999a)
ΔHOPEMNV	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>lcrV</i> Δ <sub>6-319</sub>	(Marenne <i>et al.</i> , 2003)
ΔHOPEMNVQ	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>lcrV</i> Δ <sub>6-319</sub> <i>yopQ</i> <sub>17</sub>	(Marenne <i>et al.</i> , 2003)
<b>Plasmides</b>		
pUCGm	Ap <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup>	(Schweizer, 1993)
pBluescriptII SK <sup>+</sup>	Ap <sup>r</sup> ; vecteur de clonage	Statagene
pGEM-T	Ap <sup>r</sup> ; vecteur de clonage	Promega
pUC18	Ap <sup>r</sup> ; vecteur de clonage	NewEngland Biolabs
pET-15b	Ap <sup>r</sup> ; plasmide de surexpression	Novagen
pRK2013	Km <sup>r</sup> ; ColE1 <i>mob</i> <sup>+</sup> <i>tra</i> <sup>+</sup> (RK2), plasmide mobilisable	(Konyecsni et Deretic, 1988)
pEX100T	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); vecteur suicide portant le gène <i>sacB</i>	(Schweizer et Hoang, 1994)
pIA60	Ap <sup>r</sup> ; pUC18, insert de 7 kb <i>EcoRI</i> contenant les opérons <i>pcrGVHpopBD</i> et <i>exsCBA</i>	(Schoehn <i>et al.</i> , 2003)
pIA101*	Ap <sup>r</sup> ; pUCp20- <i>gfpmut3</i> avec une délétion de la région -10 de <i>plac</i>	(Dacheux <i>et al.</i> , 2001a)

pIApG	Ap <sup>r</sup> ; fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>pcrGVHpopBD</i> ( <i>pG</i> ) et le gène <i>gfpmut3</i>	(Goure <i>et al.</i> , 2004)
pIApC	Ap <sup>r</sup> ; fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>exsCBA</i> ( <i>pC</i> ) et le gène <i>gfpmut3</i>	(Dacheux <i>et al.</i> , 2001a)
<b>Mutagenèse des gènes <i>popB</i> et <i>popD</i></b>		
pJG1	Ap <sup>r</sup> ; pUC18, insert de 426 pb <i>EcoRI/BamHI</i> , 5' <i>popB</i>	ce travail
pJG2	Ap <sup>r</sup> ; pUC18, insert de 526 pb <i>BamHI/HindIII</i> , 3' <i>popD</i>	ce travail
pJG3	Ap <sup>r</sup> ; insertion de 526 pb <i>BamHI/HindIII</i> de pJG2 dans pJG1	ce travail
pJG4	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> ; insertion de 855 pb <i>SmaI</i> (cassette Gm) de pUCGm dans pJG3	ce travail
pJG5	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de 1,8 kb <i>EcoRI/HindIII</i> de pJG4 dans pEX100T en <i>SmaI</i>	ce travail
<b>Complémentation du mutant <math>\Delta popBD</math></b>		
pJG6	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de <i>popB XbaI/HindIII</i> en aval de <i>pG</i> dans pIApG <i>XbaI/HindIII</i>	ce travail
pJG7	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de <i>popD XbaI/HindIII</i> en aval de <i>pG</i> dans pIApG <i>XbaI/HindIII</i>	ce travail
pJG8	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de <i>popBD XbaI/HindIII</i> en aval de <i>pG</i> dans pIApG <i>XbaI/HindIII</i>	ce travail
pJG12	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de <i>pcrHpopBD, XbaI/HindIII</i> en aval de <i>pG</i> dans pIApG <i>XbaI/HindIII</i>	ce travail
<b>Mutagenèse de <i>pcrV</i> et complémentation</b>		
pJG9	Ap <sup>r</sup> ; pEX100T, insert de 1,6 kb <i>SmaI, pcrV</i>	ce travail
pJG10	Ap <sup>r</sup> ; délétion du fragment <i>SacI-SalI</i> de pJG9	ce travail
pJG11	Ap <sup>r</sup> (Cb <sup>r</sup> ); insertion de <i>pcrV XbaI/HindIII</i> en aval de <i>pG</i> dans pIApG <i>XbaI/HindIII</i>	ce travail
<b>Sur-expression de PcrV, PopB et PopD</b>		
pET/ <i>popBpcrH</i>	Ap <sup>r</sup> ; pET-15b, vecteur bicistronique permettant la co-expression de His <sub>6</sub> -PopB et His <sub>6</sub> -PcrH	(Schoehn <i>et al.</i> , 2003)
pET/ <i>popDpcrH</i>	Ap <sup>r</sup> ; pET-30b, vecteur bicistronique permettant la co-expression de PopD et His <sub>6</sub> -PcrH	(Schoehn <i>et al.</i> , 2003)
pET/ <i>pcrV</i>	Ap <sup>r</sup> ; pET-15b, vecteur permettant la sur-expression de His <sub>6</sub> -PcrV	(Schoehn <i>et al.</i> , 2003)

**Tableau II.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés.**

Ap, ampicilline; Cb, carbénicilline; Gm, gentamycine; Km, kanamycine; Tc, tétracycline

## 1.B- Cultures bactériennes

Les cultures liquides sont effectuées à 37°C, sous une agitation de 300 rpm et dans un volume représentant le dixième du volume total du flacon afin d'assurer une bonne oxygénation.

### 1.B.1- Culture d'*Escherichia coli*

*E. coli* est cultivée en aérobiose à 37°C en milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989):

Bactotryptone .....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	10 g
Eau qsp.....	1000 ml
Agar.....	15 g (pour milieu solide)

### 1.B.2- Culture de *Pseudomonas aeruginosa*

Les cultures liquides de *P. aeruginosa* sont également réalisées en milieu LB à 37°C en aérobiose.

Le milieu gélosé PIA (Pseudomonas Isolation Agar ☐ DIFCO, Détroit, USA) est utilisé pour cultiver et sélectionner *P. aeruginosa*.

### 1.B.3- Utilisation d'antibiotiques

Les solutions sont stérilisées par filtration sur Millipore 0,22 µm. Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes.



Antibiotiques	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	
		milieu gélosé	milieu liquide
Ampicilline (Ap)	100	-	-
Carbénicilline (Cb)	-	1000	300
Gentamycine (Gm)	15	400	200
Kanamycine (Km)	25	-	-
Tétracycline (Tc)	10	300	100

#### 1.B.4- Mesure de la croissance bactérienne

En milieu liquide, la concentration est estimée par rapport à la densité optique suivant la relation  $\square DO_{600} = 1 \longleftrightarrow 6.10^8 P. aeruginosa/ml$ .

#### 1.B.5- Conservation des souches

Les souches d'*E. coli* sont stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans leur milieu de culture additionné de glycérol 40% (p/v).

Les souches de *P. aeruginosa* sont stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  sur des billes.

#### 1.C- Induction *in vitro* du SSTT

Les souches de *P. aeruginosa* sont cultivées toute la nuit en milieu LB avec l'antibiotique approprié, à  $37^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm. Le lendemain, elles sont diluées à une  $DO_{600}$  de 0,2 dans du milieu LB déplété en calcium (condition inductrice) contenant 5 mM d'EGTA et 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ , puis remises en culture à  $37^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm. Lorsque la  $DO_{600}$  atteint 0,8, les bactéries sont collectées puis centrifugées 10 min à 10000 rpm, à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant de culture est ensuite prélevé et dilué dans du tampon de dénaturation 4X (Tris, HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v),  $\beta$ -mercaptoéthanol 10% (v/v), glycérol 40% (v/v), bleu de bromophénol 0,04% (p/v)). Les protéines contenues dans les surnageants sont ensuite séparées par SDS-PAGE (cf. § 4.A.2).

## 2- Techniques de biologie moléculaire

### 2.A- Méthodes usuelles

#### 2.A.1- Dosages des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont dosés par spectrophotométrie (Sambrook *et al.*, 1989). La concentration en acides nucléiques est proportionnelle à l'absorbance à 260 nm. Elle est déduite de la relation suivante □ ADN bicaténaire □  $A_{260} = 1 \text{ <-----> } 50 \text{ } \mu\text{g ADN/ml}$

#### 2.A.2- Précipitation des acides nucléiques à l'éthanol

Les acides nucléiques sont capables de précipiter en présence de sels et d'éthanol. On ajoute à la solution d'acides nucléiques, 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et deux volumes d'éthanol absolu froid. La précipitation se fait à -20°C pendant 1 h. Les acides nucléiques sont récupérés par une centrifugation à 12 000 rpm à 4°C, pendant 10 min. Le culot est lavé de ses sels par un mélange éthanol/TE (70/30, v/v), séché puis repris dans du TE-RNase (Tris, HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8, RNase A 0,1 mg/ml).

#### 2.A.3- Préparation d'acides nucléiques

##### 2.A.3.1- Synthèse d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste en l'amplification d'un fragment d'ADN cible, au moyen d'une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) à partir de deux amorces oligonucléotidiques (Tableau II.2), de polarité opposée, spécifiques de chacune des bornes du fragment à amplifier. La réaction commence par une dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, suivie de 25 à 30 cycles de synthèse et se termine par une élongation de 10 min à 72°C. Un cycle de synthèse est constitué de 3 étapes □

- dénaturation de la matrice ADN, par chauffage 1 min à 95°C
- hybridation des amorces. La température d'hybridation est estimée pour chaque oligonucléotide selon la relation suivante □  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . L'hybridation des amorces est effectuée à  $T_m - 5^\circ\text{C}$ , pendant 1 min.

- élongation par l'ADN polymérase.

Nom de l'amorce	Séquence d'ADN	utilisation
OG1	5'-TCGGATCCGTGATGTTGCGTCGGC	construction de pIApG
OG2	5'-TCGGATCCGCAGGGTGTCTTCGG	construction de pIApG
5'popB- <i>EcoRI</i>	5'-TCCGGAATTCAGGCACTGTGCA	construction de pJG2
3'popB- <i>BamHI</i>	5'-CCACTCCGGGGATCCCGCAGACT	construction de pJG2
5'popD- <i>BamHI</i>	5'-GAGTCTGCGGGATCCCGGAGT	construction de pJG1
3'popD- <i>HindIII</i>	5'-GTCGTAGGGAAGCTTGCAGAA	construction de pJG1
5'popB- <i>XbaI</i>	5'-CTAGTCTAGATAACCGCGAGAAAGGATC	constructions de pJG6 et 8
3'popB- <i>HindIII</i>	5'-TACCCAAGCTTACGTCTCCTCAGATCGC	construction de pJG6
5'popD- <i>XbaI</i>	5'-GCTAGTCTAGAGATCTGAGGAGACGTCAC	construction de pJG7
3'popD- <i>HindIII</i>	5'-TACCCAAGCTTAGACGGCTCAGACCACT	constructions de pJG7, 8 et 12
5'pcrH- <i>XbaI</i>	5'-GCTAGTCTAGACGATCTAGAGGTATCCATG	construction de pJG12
5' <i>SmaI</i> - <i>pcrG</i>	5'-TGACCCGGGATGGGCGACATGAACGAATACAC	construction de pJG9
3' <i>SmaI</i> -2	5'-TACCCGGGCCGAGTAGAAGC	construction de pJG9
5'pcrV- <i>XbaI</i>	5'-CTAGTCTAGAACGCCGATGCGTGGCTTGTT	construction de pJG11
3'pcrV- <i>HindIII</i>	5'-TACCCAAGCTTACCTTTAGATGGCGCTGA	construction de pJG11

**Tableau II.2. Oligonucléotides utilisés au cours de ces travaux.**

Les sites de restriction incorporés dans les amorces sont indiqués en souligné.

### 2.A.3.2- Préparation d'ADN chromosomique de *P. aeruginosa*

Les cellules d'une culture de *P. aeruginosa* (30 ml de milieu LB centrifugés à 10000 rpm, 10 min) sont remises en suspension dans 10 ml de TE, 1% SDS. La suspension est incubée à 65°C jusqu'à lyse complète des bactéries, puis 1 ml de perchlorate de sodium 5 M est ajouté. Les protéines sont éliminées par deux extractions phénol-chloroforme. Les acides nucléiques sont précipités à l'éthanol puis lavés à l'éthanol/TE. Après séchage, le culot est repris dans du TE-RNase.

### 2.A.3.3- Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

- Extraction rapide de plasmide ou minipréparation (pour 3 ml de culture) (Birnboim et Doly, 1979).

Les cellules (1,5 ml d'une culture de nuit) sont centrifugées dans un tube Eppendorf pendant 10 min à 12 000 rpm, puis le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µl de GTE (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH8). Les bactéries sont lysées à froid, par ajout de 200 µl de NaOH 0,2 N, SDS 1%, pendant 10 min. A basse température, l'ADN chromosomique est dénaturé par la soude alors que l'ADN plasmidique, sous forme superenroulée, n'est pas altéré par le traitement. Le pH est alors neutralisé par 150 µl d'acétate de potassium 5 M, pH 5,2. Après agitation au vortex, on laisse incuber 10 min sur la glace. On centrifuge 10 min à 12000 rpm, à 4°C afin d'éliminer le précipité apparu. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité à l'éthanol absolu. Le culot obtenu est lavé dans le mélange éthanol/TE, séché au lyophilisateur rotatif et repris dans 50 µl de TE-RNase.

- Midipréparation d'ADN plasmidique

La préparation d'ADN plasmidique en grande quantité est réalisée à partir de 30 ml de culture d'*E. coli*. Pour cette purification, les kits Genomed, JetStar 2.0 (Bioprobe, Montreuil, France) et Macherey-Nagel, Nucleobond PC 100 ont été utilisés selon les protocoles fournis par les fabricants.

## 2.B- Electrophorèse d'ADN

### 2.B.1- Gel d'agarose

La migration électrophorétique en gel d'agarose permet de séparer les fragments selon leur taille. La concentration en agarose du gel est proportionnelle à la taille des fragments à séparer. Couramment, on utilise des gels d'agarose à 0,8% dans le tampon TBE (Tris base 89 mM, acide borique 89 mM, Na<sub>2</sub>EDTA, 2,5 mM). Les échantillons déposés sur le gel sont mélangés (1/5 (v/v)) à une solution de charge (saccharose 50%, EDTA 1mM, bleu de bromophénol 0,25%) afin d'augmenter la densité des échantillons et de les entraîner au fond des puits. La migration se fait à 90 V, dans du tampon TBE, BrEt (0,6 µg/ml). Après migration, l'ADN est visualisé par fluorescence du BrEt sous ultraviolets (UV).

## 2.B.2- Gel d'acrylamide

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide 5% est utilisée pour séparer les fragments d'ADN linéaires de taille inférieure à 1000 pb. La migration des échantillons, mélangés à la solution de charge, s'effectue à 200 V dans du tampon TBE 1X, pendant 20 min.

Composition du gel: - Acrylamide 30%, Bisacrylamide 0,8%.....1,6 ml  
- TBE 10X.....1 ml  
- TEMED .....10  $\mu$ l  
- Persulfate d'ammonium 10%.....200  $\mu$ l  
- eau milliQ.....7,4 ml

Après migration, le gel est coloré dans une solution de TBE, BrEt (1 $\mu$ g/ml), permettant de visualiser l'ADN sur une table d'UV.

## 2.C- Récupération de fragments d'ADN

### 2.C.1- Digestion enzymatique de l'ADN

Les endonucléases coupent l'ADN double brin au niveau de sites de reconnaissance spécifiques à chaque enzyme. Elles sont utilisées selon les instructions du fabricant. Les conditions de l'incubation peuvent varier selon l'enzyme. On arrête la digestion soit par inactivation à la chaleur, soit avec la solution de charge si l'on effectue ensuite une électrophorèse.

### 2.C.2 - Récupération de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Après migration du gel d'agarose, la portion du gel contenant le fragment à extraire est découpée sur une table d'UV. L'extraction est réalisée en utilisant les kits, «Gel Extraction Spin Kit» de Genomed ou «NucleoSpin» de Macherey-Nagel selon les protocoles indiqués par les fabricants.

### **2.C.3- Récupération de fragment d'ADN à partir d'un gel d'acrylamide**

Après migration et coloration du gel d'acrylamide au BrEt, le fragment d'ADN à récupérer est visualisé sous UV, découpé puis incubé à 37°C dans 500 µl de TE/NaCl 1,5 M, sous agitation pendant une nuit. L'ADN est ensuite précipité à l'alcool.

## **2.D- Clonage**

### **2.D.1- Déphosphorylation d'ADN double brin**

Dans certains clonages, le vecteur doit être déphosphorylé afin d'éviter qu'il ne se referme sur lui-même lors de l'étape de ligation. L'enzyme qui catalyse cette réaction est la phosphatase alcaline de crevette (Promega). Cette enzyme (0,1 à 0,5 U/µg d'ADN) est incubée pendant 45 min à 37°C, en présence d'ADN et de 1 µl de tampon 10 X, dans un volume final de 10 µl. Elle est ensuite inactivée à 65°C pendant 15 min.

### **2.D.2- Génération d'extrémités franches par l'ADN polymérase I de Klenow**

Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, de part son activité polymérase de 5' vers 3', est utilisé pour remplir les extrémités 5' sortantes de fragments d'ADN, générant ainsi des extrémités franches. L'enzyme utilisée à 0,5 U/µg d'ADN est incubée 10 min à 37°C dans un volume final de 20 µl contenant 0,2 mM des quatre nucléotides. Elle est ensuite inactivée par une incubation 10 min à 65°C, puis l'ADN est précipité à l'alcool absolu.

### **2.D.3- Ligation**

Le vecteur hydrolysé et le fragment d'ADN sont ligués par une enzyme, l'ADN ligase, suivant un rapport moléculaire allant respectivement de 1/2 à 1/5. On utilise les kits de ligation rapide commercialisés par Roche et BioLabs selon les instructions des fournisseurs.

## 2.D.4- Transformation

### 2.D.4.1- Transformation d'*E. coli*

Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  "Subcloning Efficiency" (Gibco BRL) sont utilisées selon les instructions du fabricant. La transformation est réalisée en ajoutant 5 à 10  $\mu$ l du mélange de ligation à 100  $\mu$ l de ces bactéries. Après 20 min d'incubation dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique de 45 sec à 42°C. Après un refroidissement de 2 min sur la glace, 600  $\mu$ l de milieu LB sont ajoutés. Les bactéries transformées sont ensuite incubées 1 h à 37°C à 200 rpm, puis étalées sur milieu gélosé contenant l'antibiotique de sélection.

### 2.D.4.2- Transformation de *P. aeruginosa*

Deux méthodes sont utilisées pour transformer *P. aeruginosa*.

-L'électroporation consiste à rendre les cellules perméables au moyen d'une décharge électrique. On utilise la technique de Enderle et Farwell (1998) afin de préparer des cellules de *P. aeruginosa* électrocompétentes (Enderle et Farwell, 1998). Environ 3 mg de bactéries sont prélevés sur une boîte fraîche (étalement de 16 h), lavés deux fois à l'eau stérile puis repris dans 40  $\mu$ l d'eau stérile. Cette suspension de bactéries électrocompétentes est mélangée avec 5 à 50 ng d'ADN resuspendus dans du tampon TE. Ce mélange est transféré dans une cuve d'électroporation, préalablement refroidie à 4°C, à laquelle est appliquée une décharge de 1,25 kV/cm<sup>2</sup> (appareil Electro Cell Manipulator ECM 395, BTX). Le mélange est repris dans 0,9 ml de LB, puis incubé 1 h à 37°C sous une agitation ménagée (200 rpm). Les transformants sont sélectionnés sur du milieu PIA qui contient l'antibiotique approprié.

-La transformation par choc thermique (Chuanchuen *et al.*, 2002). Cette technique consiste à rendre *P. aeruginosa* compétent pour la transformation chimique. 1 ml d'une culture saturée de *P. aeruginosa* est centrifugé 30 sec à 13 000 g, à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 1 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M froid, puis centrifugé 30 sec à 13 000 g. Les bactéries sont ensuite reprises dans 1 ml d'une solution TG-salts froide (CaCl<sub>2</sub> 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, glycérol 15% (m/v)), puis incubées dans la glace pendant 10 min. Après cette incubation, les bactéries sont centrifugées 30 sec à

13 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 200 µl de TG-salts froid. Les cellules de *P. aeruginosa* sont prêtes ainsi pour la transformation.

100 µl de cette suspension de bactéries compétentes sont transférés dans un tube Eppendorf refroidi à 4°C, et mélangés avec 100 à 1000 ng d'ADN plasmidique resuspendus dans de l'eau stérile. Ce mélange est incubé 15 min sur la glace. Ensuite le choc thermique est réalisé par une incubation de 2 min à 37°C. Le mélange est immédiatement repris dans 500 µl de LB puis incubé 1h à 37°C sous agitation ménagée (200 rpm). Les transformants sont sélectionnés sur milieu PIA contenant l'antibiotique approprié.

## **2.E- Marquage non radioactif de fragments d'ADN par la méthode de « Random priming et détection des sondes marquées**

La digoxygénine est un haptène lié à un dUTP (DIG-dUTP), qui est incorporé dans un fragment d'ADN comme un nucléotide normal, lors d'une réaction de polymérisation.

Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I synthétise le brin complémentaire du fragment d'ADN dénaturé en incorporant du dATP, dCTP, dGTP, dTTP et DIG-dUTP. Après hybridation aux acides nucléiques cibles, les sondes sont détectées grâce à un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline catalyse en présence de X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) et de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) la formation d'un précipité insoluble de couleur brune. Ceci permet de visualiser les molécules hybrides.

Les produits utilisés sont commercialisés par la société Roche.

### **2.E.1- Marquage non radioactif à la digoxygénine**

Le fragment d'ADN (10 ng à 3 µg) est dénaturé par chauffage (10 min à 95°C) et refroidi rapidement dans de la glace. On ajoute ensuite:

- 2 µl d'hexanucléotides qui vont s'hybrider de façon aléatoire sur l'ADN que l'on veut marquer et qui vont servir d'amorces à l'ADN polymérase.

- 2 µl du mélange de désoxynucléotides (dATP, dCTP et dGTP 1 mM, dTTP 0,35 mM et DIG-dUTP 0,65 mM).

- 1 µl d'enzyme Klenow (2U)



- eau qsp 20 µl

Le mélange est incubé au moins 1 h à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 2 µl d'EDTA, 0,2 M (pH 8). L'ADN est précipité par 2,5 µl de LiCl 4 M et 75 µl d'éthanol absolu, pendant 1 h à -20°C, puis récupéré, séché et remis en suspension dans 50 µl de TE. La sonde synthétisée est réutilisable plusieurs fois.

### **2.E.2- Détection des fragments marqués à la digoxigénine**

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont fixés les fragments d'ADN hybridés à la sonde marquée à la digoxigénine, est traitée de la manière suivante (sous agitation) □

- 2 fois 2 min dans le tampon 1 (acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)
- 30 min dans le tampon 2 (1% (p/v) de réactif bloquant dans le tampon 1)
- 30 min dans l'anticorps conjugué (750 U/ml) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans le tampon 2
- 2 lavages de 15 min dans le tampon 1
- 2 min d'équilibration dans le tampon 3 (Tris-HCl 100mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM)
- Coloration à l'obscurité et sans agitation dans 10 ml de tampon 3 contenant 45 µl de NBT (75 mg/ml dans le DMF 70% (v/v)) et 35 µl de X-phosphate (50 mg/ml dans le DMF).

La révélation peut durer de 5 min à plusieurs heures (réaction complète en 12 heures) et la réaction est arrêtée par lavage dans du TE. La membrane est séchée à l'air.

## **2.F- Hybridation**

Lorsque l'on recherche une colonie recombinante, après une ligation-transformation, plusieurs choix s'offrent à nous. On peut, soit effectuer des minipréparations d'ADN plasmidique d'une partie des colonies obtenues, soit faire une hybridation sur colonies. Cette deuxième méthode est privilégiée lors de clonages nécessitant une déphosphorylation du vecteur.

### **2.F.1- Transfert de colonies sur membrane de nylon Hybond-N**

Les colonies sont délicatement transférées de la boîte de Pétri sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-N de Amersham Pharmacia Biotech). La membrane est ensuite

déposée sur des feuilles de papier Whatman (3MM) imprégnées successivement dans les solutions suivantes:

- SDS 10%, 3 à 5 min
- solution dénaturante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M), 5 min
- solution de neutralisation (Tris, HCl 1M (pH 7,8), NaCl 1,5 M), 2 fois 5 min
- solution de transfert SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrate de sodium 30 mM, pH 7), 5 min

Lorsque le transfert est terminé, la membrane est séchée et l'ADN est fixé à celle-ci par exposition aux UV. L'hybridation est ensuite réalisée dans les conditions décrites dans le paragraphe 2.F.3.

### **2.F.2- Transfert de fragment d'ADN sur membrane de nylon Hybond-N**

Après avoir été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham) à l'aide d'un appareil de transfert sous vide (Vacugene, Pharmacia). La membrane de nylon est placée sur la phase poreuse de l'appareil. Un film plastique, dans lequel une fenêtre de taille légèrement inférieure à celle du gel à été découpée, est placée sur la membrane de nylon. Le gel est posé sur la fenêtre. Une dérépression est établie grâce à une pompe à vide. Les solutions suivantes sont ensuite déposées sur le gel □

- solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M), 15 min
- solution de neutralisation (Tris, HCl 1M (pH 7,8), NaCl 1,5 M), 2 fois 5 min
- solution de transfert SSC 20X (NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3 M, pH 7), 1h

Lorsque le transfert est achevé, la membrane est séchée et les acides nucléiques sont fixés par une exposition aux UV. L'hybridation est ensuite réalisée dans les conditions décrites dans le paragraphe suivant.

### **2.F.3- Hybridation ADN-ADN**

La membrane de nitrocellulose ou de nylon est placée dans un tube Appligene et traitée de la manière suivante □

- pré-hybridation □ 1 h à 68°C dans la solution SSC 5X, bloquant 1%, N-lauroylsarcosine 0,1%, SDS 0,02%. Cette étape a pour but de saturer la membrane afin de limiter le bruit de fond lors de la révélation. Une fois la pré-hybridation terminée, on élimine le liquide.

- hybridation une nuit à 68°C dans le tampon de pré-hybridation contenant au moins 20 ng de sonde marquée.
- lavage de la membrane:
  - 2 fois 5 min à température ambiante dans une solution SSC 2X, SDS 0,1%.
  - 2 fois 15 min à 68°C dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1%.
- détection (cf § 2.E.2)

### 3- Mutagenèse des gènes *pcrV*, *popB* et *popD* de *P. aeruginosa*

Ces trois mutants ont été construits par une stratégie similaire comportant trois étapes:

- 1- construction d'un plasmide suicide portant le gène cible tronqué ou interrompu par fragment d'ADN, par exemple une cassette de résistance à un antibiotique.
- 2- introduction de ce plasmide dans *P. aeruginosa* par conjugaison triparentale.
- 3- sélection des transconjuguants ayant subi une double recombinaison homologue

#### 3.A- La conjugaison triparentale

La conjugaison bactérienne est un processus parasexuel permettant de transférer du matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Dans notre cas, le plasmide transféré, pEX100T contient le site *mob* (incluant l'origine de transfert, *oriT*, et les gènes de mobilisation) ainsi que les gènes *bla* et *sacB*. Ce plasmide est incapable de se répliquer dans *P. aeruginosa*, on parle alors de plasmide suicide. Ce plasmide peut être mobilisé dans *E. coli* et introduit par conjugaison dans *P. aeruginosa* lorsqu'il est mis en présence des éléments de transfert. Ces derniers sont apportés par un plasmide «Helper» (pRK2013).

Afin d'introduire le plasmide suicide dans *P. aeruginosa*, on réalise une conjugaison dite triparentale, faisant intervenir trois souches bactériennes différentes:

- une souche donneuse d'*E. coli* portant le plasmide non conjugatif,
- une souche receveuse de *P. aeruginosa*,
- une souche mobilisatrice d'*E. coli* portant le plasmide helper pRK2013.

Les trois souches sont mises en culture dans du milieu LB. Lorsque les cultures sont en phase exponentielle de croissance, 25 µl de chaque culture sont mélangés et déposés en

une goutte sur du milieu gélosé LB. Après 6 h d'incubation à 37°C, le tapis bactérien est récupéré et repris dans 1 ml de LB. Différentes dilutions sont ensuite étalées des boîtes de milieu sélectif PIA en présence de l'antibiotique approprié, afin de sélectionner les transconjugants de *P. aeruginosa*.

### 3.B- Sélection des doubles recombinants

La sélection des transconjugants ayant subi une double recombinaison s'effectue en deux étapes:

1- une sélection après la conjugaison triparentale, des transconjugants ayant subi une simple recombinaison homologue. Un simple événement de recombinaison conduit à l'intégration du plasmide entier dans le chromosome bactérien. On sélectionne les colonies résistantes à la carbénicilline.

2- Excision du vecteur portant le gène sauvage par un deuxième événement de recombinaison homologue. Cet événement permet l'échange du gène sauvage du chromosome bactérien par le gène muté du plasmide. Le gène sauvage est alors éliminé en même temps que le plasmide. Le gène *sacB* porté par le plasmide pEX100T est un marqueur de contre-sélection, il nous permet de sélectionner les doubles recombinants. Ce gène code pour une levanesucrase, qui, lorsqu'elle est exprimée en présence de saccharose, conduit à la mort cellulaire. En effet, cette enzyme hydrolyse le saccharose et synthétise des polymères branchés de résidus fructosyls, qui sont létaux pour un large spectre de bactéries à Gram négatif. On sélectionne donc les doubles recombinants, qui ont excisé le plasmide portant *sacB* et *bla*, par leur résistance au saccharose et leur sensibilité à la carbénicilline.

### 3.C- Construction du mutant CHA $\Delta$ *popBpopD*

La région 5' flanquante du gène *popB* ainsi que la région 3' flanquante du gène *popD* ont été amplifiées par des réactions de PCR. Pour ces réactions, nous avons utilisé comme polymérase, la Vent DNA polymérase (Biolabs) qui est une polymérase thermophile hautement fidèle et générant à 95% des extrémités franches. Les oligonucléotides utilisés pour amplifier la région 5' flanquante de *popB* sont 5'*popB-EcoRI* et 3'*popB-BamHI*, lesquels possèdent respectivement un site *EcoRI* et un site *BamHI* dans leur extrémité 5'. L'amplification, par PCR, avec ces oligonucléotides a donné un produit unique de 426 pb,

que l'on a cloné dans le plasmide pUC18, générant pJG1. L'amplification de la région 3' flanquante de *popD* a été réalisée avec les oligonucléotides 5'*popD*-*Bam*HI et 3'*popD*-*Hind*III et, lesquels possèdent respectivement un site *Hind*III et un site *Bam*HI dans leur extrémité 5'. L'amplification par PCR avec ces deux oligonucléotides a donné un produit unique de 526 pb, que l'on a cloné dans le plasmide pUC18, générant pJG2. Le clonage du fragment *Bam*HI-*Hind*III de 526 pb issu de pJG2 dans pJG1, ouvert par *Bam*HI-*Hind*III, a généré le plasmide pJG3.

Une digestion du plasmide pUCGm par *Sma*I, permet de sortir un fragment de 855 pb contenant uniquement le gène de résistance à la gentamycine. Cette cassette Gm<sup>r</sup> a été insérée par ligation à bouts francs dans le plasmide pJG3, préalablement coupé par *Bam*HI et traité par l'enzyme de Klenow. L'orientation de la cassette a été déterminée par analyse de restriction. Seul le plasmide pJG4, contenant la cassette Gm<sup>r</sup> dans l'orientation sens, a été sélectionné. Ensuite, le fragment de 1,8 kb *Eco*RI-*Hind*III issu de pJG4 a été traité par l'enzyme de Klenow et cloné par ligation à bouts francs dans le plasmide pEX100T, préalablement coupé par *Sma*I. Le plasmide suicide résultant est appelé pJG5. Ce dernier va être introduit dans la souche CHA de *P. aeruginosa* par conjugaison triparentale, comme décrit dans ce chapitre paragraphe 3.A.

Les simples recombinants sont sélectionnés sur un milieu PIA contenant de la carbénicilline (PIA-Cb<sub>1000</sub>). Ces derniers sont étalés sur milieu PIA-saccharose 5% (m/v) afin de sélectionner les doubles recombinants. Les colonies obtenues sont repiquées parallèlement sur du PIA-Cb<sub>1000</sub>, du PIA-Gm<sub>400</sub> et du PIA-saccharose 5%. On sélectionne les doubles recombinants sensibles à la carbénicilline et résistants au saccharose et à la gentamycine.

Les doubles recombinants sélectionnés sont vérifiés par des expériences de Southern et de Western-blot.

### 3.D- Construction des mutants CHA $\Delta$ *pcrV* et PAO1 $\Delta$ *pcrV*

Une réaction de PCR avec les oligonucléotides 5'*Sma*I-*pcrG* et 3'*Sma*I-2 a été réalisée afin d'amplifier le gène *pcrV*. Un seul produit de PCR de 1,615 kb a été obtenu. Ce dernier contient le gène *pcrV* ainsi que 308 pb de la région 5' flanquante et 410 pb de la région 3' flanquante de ce gène. Pour cette réaction de PCR, nous avons utilisé la Vent DNA polymérase (Biolabs) comme ADN polymérase. Ce fragment de PCR de 1,615 kb a été cloné dans le plasmide pEX100T préalablement linéarisé par *Sma*I, ce qui génère pJG9. Une

délétion des codons 17 à 171 de PcrV a été réalisée par une digestion de pJG9 avec *SacI* et *SalI*, suivi d'un remplissage des extrémités avec l'enzyme de Klenow et d'une religation. Le plasmide suicide généré est appelé pJG10. Ce dernier a été introduit dans les souches CHA et PAO1 de *P. aeruginosa* par conjugaison triparentale, comme décrit dans ce chapitre paragraphe 3.A.

Les simples recombinants ont été sélectionnés sur un milieu PIA-Cb<sub>1000</sub>. Ensuite, ils ont été étalés sur milieu PIA-saccharose 5% (m/v) afin de forcer l'événement de double recombinaison. Les colonies obtenues ont été repiquées, en parallèle, sur PIA-Cb<sub>1000</sub> et sur PIA-saccharose 5%. Les doubles recombinants résistants au saccharose et sensibles à la carbénicilline ont été sélectionnés.

Les doubles recombinants sélectionnés ont été vérifiés par des expériences de Western-blot.

### 3.E- Constructions des plasmides de complémentations

Tous les plasmides utilisés lors des études de complémentation ont été construits à partir du plasmide pIApG. Ce dernier a été généré par le clonage dans pIA101\* en amont du gène *gfpmut3*, de la région promotrice de l'opéron *pcrGVHpopBD* appelée *pG*, amplifiée par PCR avec les oligonucléotides OG1 et OG2 (tableau 2).

Les gènes utilisés pour la construction de ces plasmides ont été amplifiés par des réactions de PCR. Pour ces différentes PCR, nous avons utilisé la Vent DNA polymérase (Biolabs) comme ADN polymérase et le plasmide pIA60 comme matrice. Les oligonucléotides utilisés pour chaque plasmide sont décrits dans le tableau II.2. Dans chaque oligonucléotide, il a été introduit un site de restriction unique. Ainsi, chaque gène amplifié contient à chacune de ses extrémités un site de restriction unique. Ces derniers sont utilisés pour cloner chaque fragment amplifié dans le vecteur pIApG, après avoir enlevé au préalable le gène *gfp* par une digestion avec les enzymes de restriction appropriées. Tous les plasmides que nous avons construits pour les études de complémentation contiennent le ou les gènes d'intérêt(s) sous le contrôle transcriptionnel du promoteur natif *pG*. Par conséquent, l'expression des gènes portés par ces plasmides est régulée comme les autres gènes du SSTT, présents sur le chromosome bactérien. Elle est donc inductible *in vitro* par la déplétion en calcium du milieu de culture.

Ces plasmides sont introduits dans les différentes souches de *P. aeruginosa* par transformation ou électroporation (cf § 2.D.3.2).

## **4-Techniques de biochimie**

### **4.A- Techniques usuelles**

#### **4.A.1- Dosage des protéines**

Les protéines totales d'un échantillon sont dosées par une technique colorimétrique faisant intervenir l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode est basée sur la réactivité stoechiométrique des ions  $\text{Cu}^{2+}$  à l'égard des liaisons peptidiques. Les ions  $\text{Cu}^+$  libérés vont réagir avec le BCA pour former un complexe stable de couleur pourpre dont le maximum d'absorption se situe à 562 nm. Les protéines à doser sont incubées pendant 30 min à 30°C en présence de 1 ml de réactif préparé extemporanément par le mélange d'un volume de solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 4% (m/v) avec 50 volumes de la solution commerciale de BCA (Pierce, BCA- $\text{Na}_2$  1% (m/v),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  25% (m/v), tartrate de sodium 0,16% (m/v), NaOH 0,4% (m/v),  $\text{NaHCO}_3$  0,95% (p/v) pH 11,25). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par comparaison avec une gamme d'albumine de sérum de boeuf (BSA), de 0 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines, dosée dans les mêmes conditions.

#### **4.A.2- Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

La migration sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli, 1970). Des protéines de masses moléculaires connues permettent de corrélérer les distances de migration des protéines à leur masse moléculaire.

Le gel de d'acrylamide comporte un gel de séparation des protéines à pH 8,8, surmonté d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide, à pH 6,8 qui permet de concentrer les protéines. Les pourcentages d'acrylamide utilisés varient en fonction de la taille des protéines étudiées. La composition des différents gels utilisés est présentée dans le tableau II.3.

Les échantillons protéiques sont solubilisés dans le tampon de dénaturation 4X (Tris, HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), β-mercaptoéthanol 10% (v/v), glycérol 40% (v/v), bleu de bromophénol 0,04% (p/v)). Ils sont ensuite bouillis pendant 5 min.

Concentration des gels	Gel de concentration	Gel de séparation	
	5%	12%	15%
Eau (ml)	6,8	3,3	2,3
Acrylamide 30%, bisacrylamide 0,8% (ml)	1,7	4	5
Tris, HCl 1M, pH 6,8 (ml)	1,25	-	-
Tris, HCl 1,5M, pH 8,8 (ml)	-	2,5	2,5
SDS 10% (ml)	0,1	0,1	0,1
Persulfate d'ammonium 10% (ml)	0,1	0,1	0,1
TEMED (μl)	10	4	4

**Tableau II.3. Composition des différents gels d'acrylamide utilisés.**

La migration est réalisée à 30 mA dans le tampon Tris-Glycine (Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 0,1%). Le gel est ensuite soit coloré au bleu de Coomassie □ (pour visualiser les protéines) puis séché, soit transféré sur une membrane de nitrocellulose (en vue de faire un Western blot).

La coloration au bleu de Coomassie □ est réalisée par une incubation du gel dans une solution d'acide acétique/méthanol/eau (1/5/5), contenant 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie R250, pendant 30 min. Le gel est ensuite décoloré dans un mélange d'acide acétique 7% (p/v), méthanol 5% (p/v), eau. Les protéines retiennent le colorant et apparaissent donc en bleu.

Pour le séchage, le gel recouvert de Saran est séché sous vide sur du papier Whatman pendant quelques heures à 55°C.

#### **4.A.3- Analyse des protéines par Western-blot**

##### **4.A.3.1- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose**

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Towbin *et al.*, 1979). Le transfert des protéines du gel vers la membrane est réalisé par élution électrophorétique dans un appareil semi-sec. Auparavant, le



gel, la membrane (Protran BA3, 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher et Schuell) et 4 feuilles de papier Whatman 3MM sont équilibrés dans le tampon de transfert (tampon de migration Tris-glycine + 20% éthanol). Le gel est pris en sandwich selon le schéma suivant

**Cathode**  
 2 feuilles de Whatman  
 Gel de protéine  
 Membrane de nitrocellulose  
 2 feuilles de Whatman  
**Anode**

L'électrotransfert est effectué à 4°C sous un ampérage constant de 200 mA pendant 75 min.

#### 4.A.3.2- Immunodétection

Après l'électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 h à température ambiante et sous agitation dans une solution de lait écrémé à 5% (m/v) dans du tampon PBST (Phosphate Buffer Saline Tween, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM, 0,05% (m/v) Tween 20, (pH 7,4). Après 5 lavages de 5 min à température ambiante dans le PBST, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution de lait écrémé à 2% (m/v) en tampon PBST, pendant 1 h à température ambiante. Le tableau II.4 résume les différentes solutions de sérum utilisées au cours de ces travaux.

Nom	Dilution	Remarques	Références
$\alpha$ -PcrV	1/3000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés par affinité à partir du sérum total de lapin (Eurogentec)	ce travail
$\alpha$ -PopB	1/3000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés par affinité à partir du sérum total de lapin (Eurogentec)	ce travail
$\alpha$ -PopD	1/1000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux de lapin (Eurogentec)	ce travail
$\alpha$ -ExoS	1/1000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux de lapin	(Frithz-Lindsten <i>et al.</i> , 1997)
$\alpha$ -LcrV	1/1000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés de souris	O. Attrée (CRSSA)
$\alpha$ -YopB	1/1000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux de lapin	(Forsberg <i>et al.</i> , 1987)
$\alpha$ -YopD	1/1000 <sup>ème</sup>	Anticorps monoclonaux de rat	(Neyt et Cornelis, 1999b)

**Tableau II.4. Nature et dilution des anticorps utilisés en Western-blot.**

L'incubation avec l'anticorps primaire est suivie de 5 lavages de 5 min par du PBST à température ambiante. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du tampon PBST, 2% lait écrémé (m/v). Selon l'origine de l'anticorps primaire, on utilise des anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (Sigma) ou des anticorps de lapin anti-IgG de souris couplés à la même enzyme (Sigma). Après 5 lavages de 5 min de la membrane dans du tampon PBST, la présence de la peroxydase est révélée grâce au kit ECL (Enhanced Chemio Luminescence, Amersham). La chimioluminescence du luminol oxydé par la peroxydase est captée par impression d'un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham).

#### **4.B- Surproduction et purification de protéines fusionnées à une queue polyhistidine**

##### **4.B.1- Surproduction des protéines de fusion dans *E. coli***

300 ml de milieu LB sontensemencés au 1/10<sup>ème</sup> avec une préculture de cellules BL21 (DE3) qui ont été transformées par le vecteur d'expression souhaité (pET/*popB*, pET/*popD* ou pET/*pcrV*) et incubés en aérobiose à 37°C sous agitation (300 tours/min). Lorsque la DO<sub>600</sub> atteint 0,6, la surexpression est induite par 0,1 mM d'IPTG, pendant 2 h à 30°C, et l'agitation est diminuée à 200 tours/min. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation (15 min, 8 000 rpm, à 4°C), lavées par 25 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 200 mM et recentrifugées comme ci-dessus. Elles sont reprises dans 10 ml d'une solution IMAC-5 (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, glycérol 10%, imidazole 5 mM) et lysées par 3 passages à la presse de French. Une première centrifugation (10 min, 8 000 rpm, 4°C) permet d'éliminer les gros débris cellulaires. La fraction cytosolique est récupérée par ultracentrifugation (45 min, 50 000 rpm, 4°C) en utilisant le rotor 60 Ti (Beckman Corp.).

##### **4.B.2- Purification par IMAC**

La purification des protéines His<sub>6</sub>-Tag est réalisée par chromatographie d'affinité sur un support portant des ions métalliques immobilisés (IMAC). Cette technique est basée sur l'affinité naturelle des résidus histidine et cystéine pour les métaux de transition. La colonne HiTrap (Pharmacia Biotechnology) que nous avons utilisée est constituée d'un support d'agarose sur lequel sont greffés les ions Ni<sup>2+</sup> grâce à un groupement chélatant, l'acide iminodiacétique. L'étiquette poly-histidine greffée aux protéines d'intérêts a pour but de

favoriser la formation d'un maximum d'interactions avec la résine et de permettre ainsi d'avoir une bonne élimination des contaminants. Nous avons utilisé des colonnes Hi-Trap de 1 ml avec un débit de colonne de 1 ml/min.

- lavage avec 3 volumes de colonne d'EDTA 100 mM (pH8).
- lavage avec 3 volumes d'eau milliQ.
- chargement des ions nickel avec 5 volumes de NiSO<sub>4</sub> 50 mM.
- équilibrage avec 3 volumes d'IMAC-5 (Tris-HCl 20 mM (pH8), NaCl 500 mM, glycérol 10%, imidazole 5 mM).
- chargement de l'extrait protéique, 10 ml de fraction cytosolique (la présence de 5 mM d'imidazole dans le tampon de chargement permet d'augmenter la rétention sélective des protéines).
- lavage avec 10 volumes du tampon d'équilibration IMAC-5
- lavage avec 10 volumes d'IMAC-50
- élution des protéines (His-Tag)-PopB et (His-Tag)-PopD avec successivement 2 fois 5 volumes d'IMAC-100 puis 2 fois 5 volumes d'IMAC-200.
- élution de la protéine (His-Tag)-PcrV avec 10 volumes d'IMAC-50 et 5 volumes d'IMAC-100.

Remarque: Les tampons IMAC ont tous la même composition que celle de l'IMAC-5, il n'y a que la concentration en imidazole qui varie (50, 100 et 200 mM).

Les protéines sont ensuite dialysées toute la nuit contre du tampon NaCl 500 mM, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 8. Le lendemain les protéines purifiées et dialysées sont utilisées pour purifier les anticorps polyclonaux par chromatographie d'affinité.

#### **4.C- Purification d'anticorps polyclonaux**

La purification des anticorps polyclonaux est réalisée par chromatographie d'affinité sur un support couplé à l'antigène purifié. Cette technique est basée sur la spécificité de la liaison antigène-anticorps. Les anticorps spécifiques de l'antigène vont interagir avec l'antigène alors que les anticorps non spécifiques vont être éliminés lors des rinçages. Nous avons utilisé comme support la résine « $\square$  Activated CH Sepharose 4B $\square$  (Pharmacia Biotechnology). Il faut tout d'abord préparer la colonne avant de la charger avec le sérum polyclonal à purifier.

Le protocole est le suivant

- peser 1g de résine «Activated CH Sepharose 4B» (pour obtenir 3 ml de gel)
- incubé 2 fois 1 h, avec agitation, dans 100 ml de HCl 1 mM, en laissant décanter entre les deux incubations
- équilibrer dans le tampon de dialyse (NaCl 500 mM, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 8) puis laisser décanter.
- couplage au ligand par incubation de la totalité de la résine avec la protéine purifiée (rapport matrice:tampon de 1:2) pendant 3 h à température en agitant par retournement sur une roue
- couler la colonne, soit 3 ml de résine
- lavage avec 5 volumes de colonne de tampon de dialyse
- blocage des sites actifs par un lavage de 1 h par du Tris-HCl 0,1 M
- lavage avec 2 cycles alternant 10 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0 et 10 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0
- chargement de la colonne avec le sérum polyclonal à purifier, par un passage en boucle pendant 1 h.
- lavage avec 2 fois 15 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4)
- élution des anticorps polyclonaux spécifiques par de la glycine 100 mM, pH 2,0. On réalise 5 fractions de 1 ml. Celles-ci sont collectées dans des tubes contenant 500 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 afin de neutraliser le pH.

Les différentes fractions sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Les fractions sélectionnées sont testées en Western blot, puis aliquotées avant d'être conservées à -20°C.

#### **4.D- Isolement des membranes de globules rouges sur gradient de saccharose par flottaison**

Les membranes de globules rouges de mouton (GRM) lysées après infection avec *P. aeruginosa* sont isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu (Blocker *et al.*, 1999).

Les bactéries et les GRM sont préparés comme décrit dans le paragraphe (5.B.3), excepté qu'ils sont resuspendus respectivement à  $1,5 \cdot 10^{10}$  et  $1 \cdot 10^{10}$  cellules/ml dans du tampon Tris-salin (Tris 30 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). La réaction hémolytique est préparée dans

des tubes Falcon de 50 ml à fond conique avec 200 µl de bactéries, 300 µl de GRM, 500 µl de tampon Tris-salin et 1 ml d'antiprotéases 2X en tampon Tris-salin (PIC, protease inhibitory cocktail □ Complete™, Roche). La réaction hémolytique est initiée par une centrifugation de 10 min à 2 000 g à température ambiante et poursuivie 1 h à 37°C. Une centrifugation de 10 min à 3 000 g, à 4°C permet d'arrêter la réaction hémolytique. L'hémolyse est évaluée en mesurant le relargage d'hémoglobine dans le surnageant cellulaire à 540 nm. Ensuite, 3 ml d'eau milliQ stérile à 4°C sont ajoutés afin de lyser totalement les hématies. Après centrifugation (8 000 rpm, 10 min à 4°C), les 5 ml de surnageant sont récupérés et mélangés à 3 g de saccharose afin d'obtenir un lysat de GRM à 60% (m/v) de saccharose. Le lysat de GRM à 60% de saccharose est déposé au fond d'un tube SW-41 (Swinging-bucket 41, Beckman Corp.). On dépose, successivement et très soigneusement, 3 ml de saccharose 44% (m/v) et 2,5 ml de saccharose 25 % (m/v), réalisés dans du tampon Tris-salin en présence d'antiprotéases 1X. Le gradient est centrifugé pendant 16 h à 15 000 g à 4°C. Les membranes de GRM sont récupérées à l'interface 44/25% de saccharose, puis diluées dans du tampon Tris-salin et concentrées par ultra-centrifugation à 450 000 g, pendant 20 min à 4°C dans des tubes TLA 100.3 (Beckman Corp.). Le culot membranaire est ensuite repris dans 80 µl de tampon de dénaturation 1X. Les protéines contenues dans les différents échantillons sont séparées par SDS-PAGE et analysées en Western blot.

Afin d'estimer le type d'association des protéines Pops aux membranes de GRM, 100 µl de membranes isolées de GRM infectés par CHAΔBD/*popBD* ont été incubées à 4°C pendant 1 h, dans 300 µl de tampon Tris-salin contenant □(i) NaCl 5 M; (ii) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 11,0; (iii) Triton X-100 1% (v/v). Pendant l'incubation, les membranes sont remises en suspension toutes les 5 minutes par aspiration-refoulement. Après l'incubation, le matériel est dilué dans du tampon Tris-salin, puis concentré par une ultracentrifugation de 20 min à 450 000 g, à 4°C. Le culot est repris dans un volume minimal de tampon de dénaturation 1X. Les protéines contenues dans ces échantillons sont séparées par SDS-PAGE puis visualisées par Western blot.

## 5- Techniques de biologie cellulaire

### 5.A- Conditions de culture

Toutes les cellules utilisées sont cultivées en monocouche en flacon, dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules sont observables sous microscope inversé. Elles sont maintenues en phase de croissance exponentielle. Lorsqu'elles atteignent environ 90% de confluence, elles sont diluées et remises en culture dans un nouveau flacon.

Les cellules sont congelées en ampoule dans une solution contenant du milieu DMEM, 10% de DMSO et 20% de sérum de veau à 4°C. Les ampoules sont laissées 5 heures à -80°C puis stockées dans de l'azote liquide.

Nous avons utilisé: - des globules rouges de mouton (GRM) (BioMérieux et Eurobio).  
- des macrophages murins J774 provenant de l'American Type Cells Collection (ATCC). Ces cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en milieu Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (glucose, glutamax-1, pyridoxine) complémenté avec 10% de SVF décomplémenté.

### 5.B- Modèles d'infection *P. aeruginosa* / cellules

#### 5.B.1- Préparation de *P. aeruginosa* pour les infections cellulaires

Les bactéries, en phase stationnaire, sont diluées à une DO<sub>600</sub> de 0,2 et remises en culture à 37°C, 300 rpm jusqu'à ce que la DO<sub>600</sub> soit comprise entre 1 et 1,2 (phase exponentielle de croissance). Les bactéries sont collectées par une centrifugation de 10 min à 10 000 rpm, à température ambiante. Les bactéries sont lavées dans le milieu de culture utilisé pour l'infection. Elles sont ensuite resuspendues dans le milieu d'infection à la concentration souhaitée, à partir de cette relation: une unité de DO<sub>600</sub> correspond à 6.10<sup>8</sup> *P. aeruginosa* /ml. La concentration, à laquelle sont diluées les bactéries, est établie selon la multiplicité d'infection (MOI).

### 5.B.2- Test de cytotoxicité envers les macrophages

L'infection est réalisée en plaques 24 puits dans un volume final de 300  $\mu$ l. Environ 24 h avant l'infection, 3 à  $5 \cdot 10^5$  macrophages sont déposés dans chacun des puits dans un volume final de 1 ml de DMEM complété avec 10% de SVF décomplété, puis incubés toute la nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Une heure avant l'infection, les cellules sont rincées avec 300  $\mu$ l de DMEM, puis ré-incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans 200  $\mu$ l de DMEM. Les macrophages sont infectés avec 100  $\mu$ l d'une suspension bactérienne (préparée comme décrit dans le paragraphe précédent) à une MOI de 10, puis incubés 2 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. La cytotoxicité est estimée en mesurant l'activité lactate déshydrogénase (LDH) qui est une enzyme cytoplasmique soluble, relarguée dans 30  $\mu$ l de surnageant cellulaire (60  $\mu$ l pour le témoin positif), avec le kit de dosage de la LDH (Cytotoxicity Detection Kit, Roche Diagnostique). Le témoin négatif est réalisé en incubant les macrophages dans 300  $\mu$ l de DMEM. Il correspond au niveau basal de relargage de LDH par les macrophages. Le témoin positif correspond à la lyse totale des macrophages. Il est réalisé en incubant les cellules avec 300  $\mu$ l de DMEM, 0,1% (v/v) Triton X-100.

### 5.B.3- Test d'hémolyse

Le test d'hémolyse est adapté de Blocker *et al.* (1999). Les GRM sont lavés trois fois en PBS, pH 7,4 (150 mM NaCl) puis resuspendus à une concentration de  $5 \cdot 10^8$  GRM/ml dans du milieu RPMI-1640 modifié (Roswell Park Memorial Institute- 1640, sans L-glutamine et rouge de phénol) et conservés à 4°C. Les bactéries sont préparées comme décrit dans le paragraphe 5.B.1, puis resuspendues à  $5 \cdot 10^8$  bactéries/ml dans du milieu RPMI-1640 modifié. L'hémolyse est réalisée dans des plaques 96 puits à fond rond. 100  $\mu$ l de la suspension de GRM et 100  $\mu$ l de la suspension bactérienne sont déposés dans chacun des puits. L'infection est initiée par une centrifugation (10 min, 1 500 g à température ambiante) et poursuivie 1 h à 37°C. Après centrifugation (10 min, 1 500 rpm à 4°C), 100  $\mu$ l de surnageant cellulaire est prélevé. L'hémolyse est alors évaluée par la mesure du relargage d'hémoglobine dans le surnageant à 540 nm. Le pourcentage (%) d'hémolyse est calculé avec la formule suivante  $\square$

$$\% \text{ d'hémolyse} = ((X-B)/(T-B)) \times 100.$$

B est le contrôle négatif correspondant à la lyse naturelle des GRM. Il est réalisé par incubation des GRM avec 100  $\mu$ l de RPMI-1640 modifié. T est le contrôle positif correspondant à la lyse totale des GRM. Il est obtenu en

incubant les GRM avec 100 µl de RPMI-1640 modifié, 0,1% (m/v) de SDS. X est la valeur de la  $DO_{540}$  de l'échantillon analysé.

Pour les expériences d'osmoprotection, on a réalisé des solutions stériles de chaque molécule osmoprotectrice à une concentration de 60 mM dans du milieu RPMI-1640 modifié. Les GRM lavés sont resuspendus à une concentration de  $5.10^8$  GRM/ml dans ces différentes solutions, puis l'hémolyse est réalisée comme décrit ci-dessus.

#### **5.B.4- Expérience d'immunoprotection des GRM**

Les expériences d'immunoprotection des GRM sont réalisées aussi bien en microplaques qu'en tubes Falcon de 50 ml à fond conique.

Cette expérience est utilisée pour évaluer la capacité des anticorps à protéger les globules rouges de la lyse médiée par *P. aeruginosa*. Le protocole expérimental est identique à celui des tests d'hémolyse (cf. § 4.D et 5.B.3), à l'exception de la préparation des bactéries. Ces dernières sont diluées dans le milieu utilisé pour l'infection, en présence de l'anticorps à tester puis incubées pendant 45 min à température ambiante. Après cette incubation, les bactéries, en présence des anticorps, sont mélangées aux GRM, puis l'infection est initiée par centrifugation. La concentration d'anticorps varie selon la quantité de bactéries utilisées pour l'infection. Des concentrations différentes d'anticorps ont été testées. Le pourcentage d'hémolyse est calculé ainsi que le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en prenant comme 100% d'inhibition, le pourcentage d'hémolyse obtenu avec la concentration la plus élevée d'anticorps.

## **6- Techniques de microscopie électronique**

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées en collaboration avec Guy Brochier (Service d'Imagerie et de Microscopie Electronique, CRSSA, La Tronche).

Après avoir été isolées par flottaison sur un gradient saccharose, les membranes de GRM sont concentrées par ultra-centrifugation à 450 000 g, pendant 20 min à 4°C dans des tubes TLA 100.3 (Beckman Corp.). Afin de fixer les échantillons, le culot membranaire est repris dans du paraformaldéhyde 1,5% en tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) pendant 1h sur la glace. Les membranes sont ensuite à nouveau ultra-centrifugées, avant d'être reprises dans 100 µl de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4).



Ensuite, 5  $\mu$ l de cette solution de membranes fixées est déposés pendant 3 minutes sur une grille de cuivre recouverte de Formvar et de carbone (Formvar-coated copper grid, 400 mesh, Agar Scientific). L'excès de solution est éliminé, puis la coloration négative est réalisée par un bain de 10 secondes à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyle 1%. La grille est ensuite placée, échantillon vers le haut, sur un papier-filtre dans une boîte de Pétri pour séchage, pendant environ 1 h.

L'échantillon est observé et photographié avec un Microscope Electronique à Transmission JEOL 1010 sous un voltage de 80 kV.

Les photographies prises en coloration négative peuvent être ensuite numérisées avec le logiciel Samba Technologies IPS.

## **CHAPITRE III**

# **ACTIVITÉ FORMATRICE DE PORES DU SSTT**



## 1- Introduction

Des travaux réalisés dans le laboratoire ont montré que la souche CHA de *P. aeruginosa* était capable d'induire une mort cellulaire dépendante du SSTT des cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles polymorphonucléaires) (Dacheux *et al.*, 1999; Dacheux *et al.*, 2000). La mort par oncose des macrophages est précédée par la formation de pores dans les membranes des cellules eucaryotes. En effet, des expériences d'osmoprotection montrent que la diminution du relargage de LDH par les macrophages infectés est proportionnelle à l'augmentation de la taille des molécules osmoprotectrices utilisées (Dacheux *et al.*, 2001b). Afin d'étudier cette activité formatrice de pore dépendante du SSTT, j'ai développé un modèle d'interaction cellulaire entre *P. aeruginosa* et des érythrocytes.

Nous avons observé que le mutant CHA-42F2, qui a été construit par insertion du transposon Tn5Tc dans le gène *pcrV*, possède un phénotype non-hémolytique (Dacheux *et al.*, 2001b). Ce mutant est déficient pour PcrV ainsi que pour les deux protéines translocatrices PopB et PopD. Ainsi, afin de déterminer l'implication de chacune de ces trois protéines dans la formation des pores, j'ai construit et étudié trois souches isogéniques de CHA déficientes pour les protéines PopB, PopD ou PcrV.

## 2- Mise en place du test hémolytique

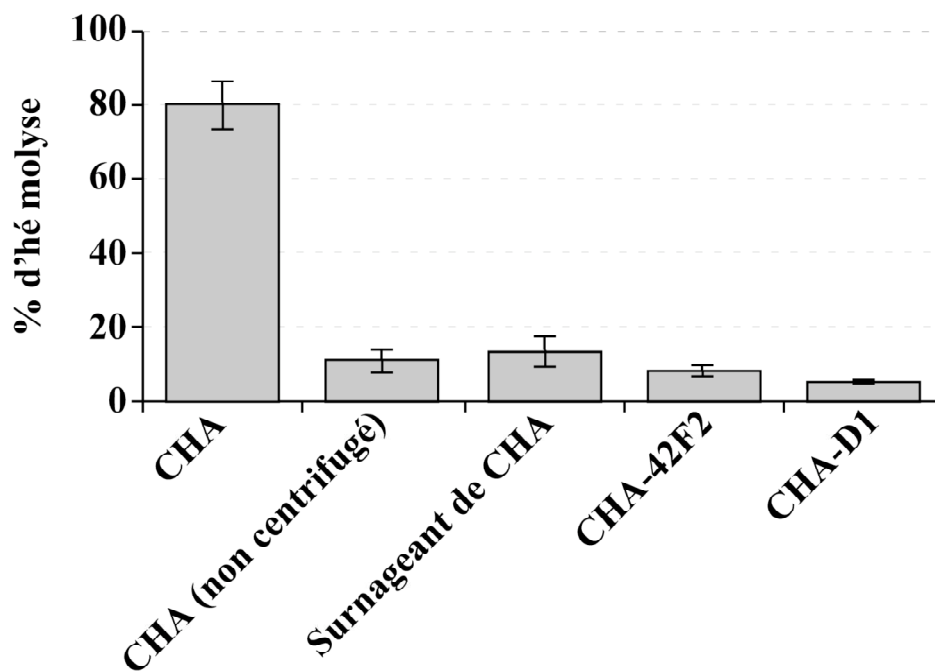
Dans un premier temps, j'ai développé un modèle d'interaction entre *P. aeruginosa* et des hématies afin d'étudier l'activité formatrice de pore de *P. aeruginosa*. Les expériences d'hémolyse sont réalisées comme décrit dans le chapitre «**Matériels et Méthodes**» (paragraphe 5.B.3). Brièvement, les infections sont réalisées dans des plaques 96 puits à fond conique pendant une heure à 37°C. Les souches bactériennes sont mélangées avec des GRMs dans du RPMI-1640 à une MOI de 1. L'activité hémolytique est déterminée en mesurant le relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection par spectrophotométrie à 540 nm.

Sur la figure III.1, on observe que la souche parentale CHA lyse entre 80 et 90 % des globules rouges après une heure d'incubation, alors que le surnageant de la culture bactérienne de CHA ne lyse qu'environ 10 % des GRM. Cependant, lorsque l'incubation à 37°C n'est pas précédée d'une centrifugation de 10 min à 1 500 g, l'hémolyse induite par la souche CHA est similaire à celle du surnageant d'une culture de CHA. L'activité hémolytique induite par CHA est donc en grande partie dépendante d'un contact bactérie-cellule. Le

mutant CHA-D1, déficient pour l'activateur transcriptionnel du SSTT ExsA, possède une activité hémolytique faible, ce qui signifie que l'activité hémolytique induite par CHA est principalement dépendante de protéines sécrétées par le SSTT (figure III.1).

Le mutant CHA-42F2, qui est déficient pour les protéines PcrV, PopB et PopD, lyse environ 10 % des globules rouges (figure III.1). L'activité hémolytique type III-dépendante induite par CHA requiert donc la présence d'une, de deux ou de ces trois protéines.

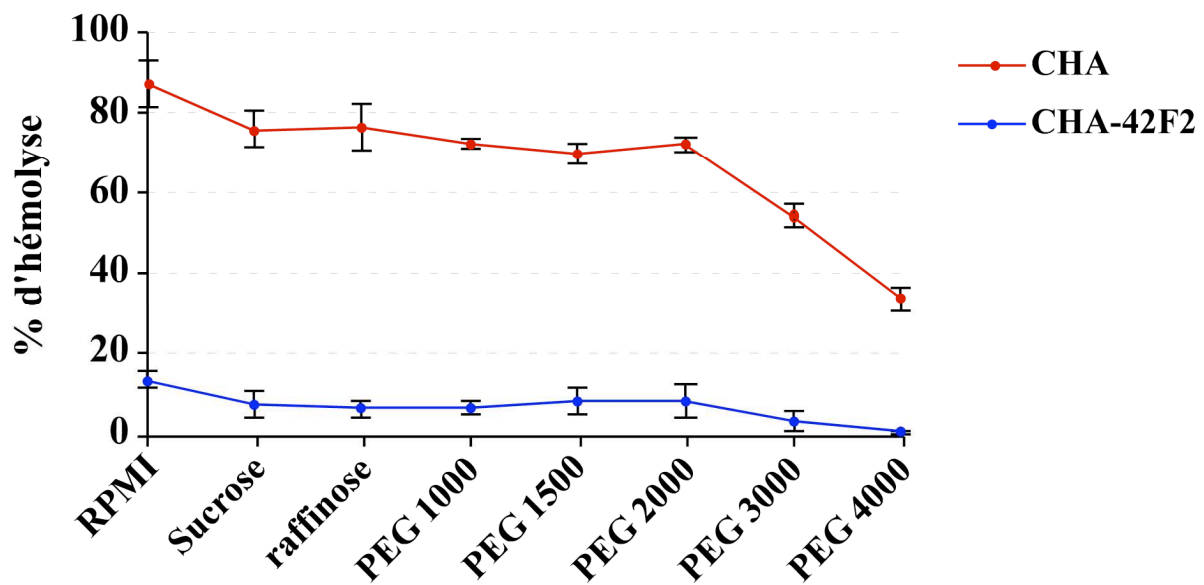
Par ailleurs, la faible hémolyse induite par le surnageant de culture de CHA et les mutants, CHA-42F2 et CHA-D1, est une activité hémolytique résiduelle. Cette dernière est probablement due à des facteurs sécrétés indépendamment du SSTT qui ne nécessitent pas de contact bactérie-cellule, comme la phospholipase C hémolytique (PLC-H). En effet, il a été observé sur des géloses au sang, que les deux souches CHA et CHA-D1 étaient capables de sécréter de façon similaire des facteurs hémolytiques indépendants du SSTT (J. Croize, Service de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, communication personnelle).



**Figure III.1.** Caractérisation de l'activité hémolytique type III et contact-dépendante induite par *P. aeruginosa*.

Les GRMs sont infectés par les souches CHA, CHA-D1 et CHA-42F2 à une MOI de 1, pendant 1 h à 37°C. 100 µl du surnageant bactérien CHA est ajouté aux GRMs, puis le mélange est incubé de la même façon que les infections bactériennes. L'hémolyse est évaluée par la mesure du relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection à 540 nm.

Les toxines bactériennes formatrices de pores provoquent la lyse des globules rouges par un choc osmotique (Menestrina *et al.*, 1994a; Menestrina *et al.*, 1994b). Cette lyse des hématies peut être prévenue par l'utilisation dans le milieu d'infection de molécules osmoprotectrices, de taille supérieure au diamètre des pores insérés, par les bactéries, dans les membranes des globules rouges. Afin d'estimer la taille de ces pores, nous avons réalisé des expériences d'hémolyse en présence de molécules osmoprotectrices de différentes tailles (Blocker *et al.*, 1999), à une concentration finale de 30 mM (figure III.2).



**Figure III.2.** Caractérisation de la taille des pores induits par l'activité formatrice de pores type III-dépendante de *P. aeruginosa*.

Les GRM sont infectés par la souche CHA à une MOI de 1, en présence des différentes molécules osmoprotectrices indiquées, utilisées à une concentration finale de 30 mM. Après 1 h d'infection à 37°C, l'hémolyse est évaluée en mesurant le relargage d'hémoglobine dans le surnageant à 540 nm.

Sur la figure III.2, on observe que le saccharose (ou sucrose, 9 Å de diamètre), le raffinose (13 Å de diamètre) et PEG 1000 (18 Å de diamètre) n'affectent pas l'efficacité de l'hémolyse induite par CHA. Seules, les molécules osmoprotectrices de taille supérieure au PEG 2000 (28 Å de diamètre) procurent une protection contre l'hémolyse induite par CHA. L'augmentation de cette protection est proportionnelle à la taille des molécules utilisées et

elle atteint environ 60% avec le PEG 4000 (environ 40 Å de diamètre). Une diminution de 50% de l'hémolyse est observée avec le PEG 3000 (environ 35 Å de diamètre), ce qui suggère que la taille des pores induits par la souche CHA de *P. aeruginosa*, dans les membranes des cellules eucaryotes, est estimée entre 28 et 35 Å.

Dans ce premier chapitre, nous avons donc montré que *P. aeruginosa* possède une activité formatrice de pores qui induit la lyse des globules rouges. Cette activité hémolytique nécessite la présence d'une, de deux ou des trois protéines, PcrV, PopB et PopD. Ces résultats ont fait l'objet d'un chapitre dans l'Article 1: Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y. et Attree I. (2001). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.*, **40**(1), 76-85 (Annexe 1).

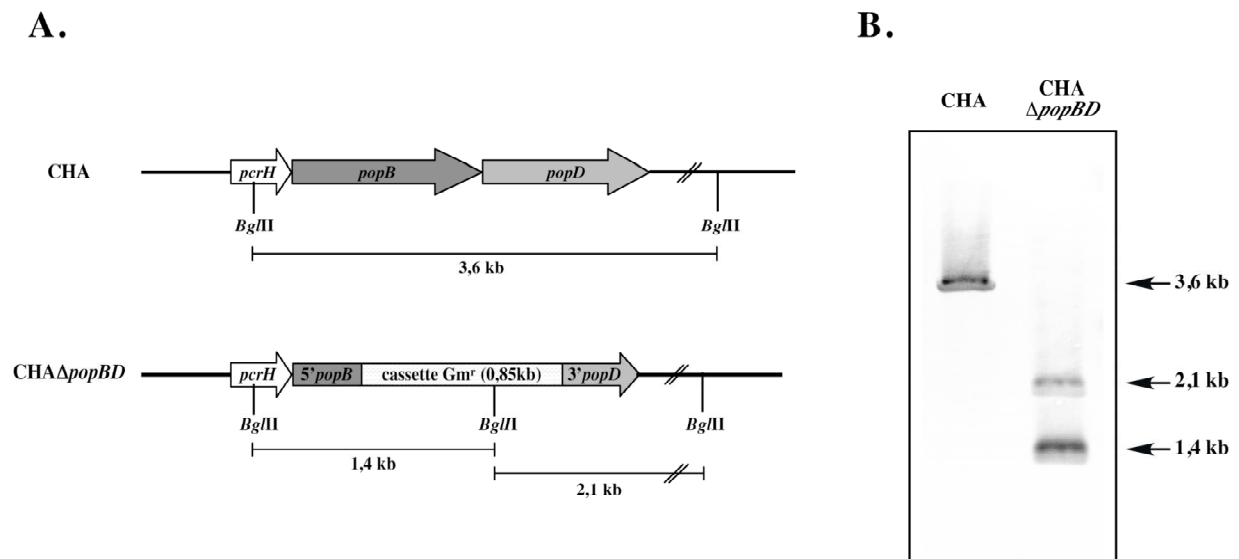
Afin d'étudier la participation individuelle de chacune des protéines, PcrV, PopB et PopD, dans l'activité hémolytique, nous avons construit trois souches isogéniques de CHA individuellement déficientes pour chacune de ces trois protéines.

### **3- Rôle des protéines PopB et PopD dans l'activité hémolytique**

#### **3.A- Caractérisation des souches isogéniques $\Delta$ PopB et $\Delta$ PopD**

Dans le but d'étudier la participation des protéines PopB et PopD dans l'activité hémolytique, j'ai construit un mutant CHA $\Delta$ popBD ( $\Delta$ popBD) par délétion partielle des gènes *popB* et *popD* et insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine (*cf.* Matériels et Méthodes). La construction plasmidique, qui contient la cassette Gm<sup>r</sup> insérée entre les régions 5' flanquante de *popB* et 3' flanquante de *popD*, a été introduite dans la souche CHA de *P. aeruginosa*. Un événement de double recombinaison occasionne un échange allélique entre les gènes *popB* et *popD* chromosomiques et l'insert plasmidique, ce qui permet l'inactivation de ces gènes dans le chromosome bactérien (figure III.3.A).

Les bactéries, ayant effectué l'événement de double recombinaison, ont été identifiées par sélection des colonies devenues d'une part, résistantes à la gentamycine et au saccharose et d'autre part, sensibles à la carbénicilline (*cf.* Matériels et Méthodes). L'une de ces colonies a été analysée par Southern blot afin de confirmer la délétion partielle des gènes *popB* et *popD* et l'insertion de la cassette Gm<sup>r</sup> (figure III.3.B).



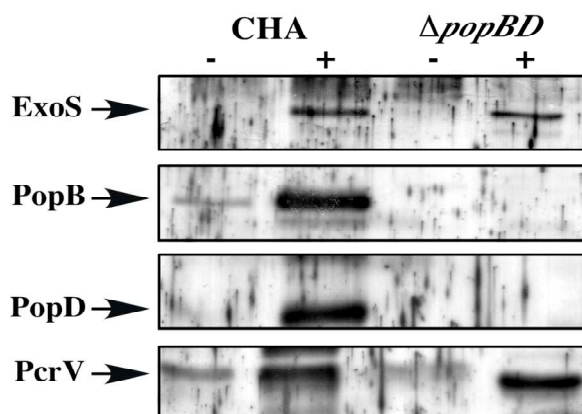
**Figure III.3. Vérification de la mutation des gènes *popB* et *popD*.**

**A.** Carte de restriction partielle des gènes *pcrHpopBD* dans la souche parentale CHA et dans le mutant *popBD*. Insertion de la cassette *Gm<sup>r</sup>* dans les gènes *popBD* mutés.

**B.** Vérification par Southern blot de l'événement de double recombinaison au niveau des gènes *popB* et *popD*. Les sondes utilisées sont les produits PCR, 5' *popB* et 3' *popD* marqués à la digoxygénine. Les échantillons d'ADN génomique sont digérés par *Bgl*III.

Le mutant isogénique, *CHAΔpopBD*, a également été caractérisé par l'analyse des protéines sécrétées *in vitro* par le SSTT dans le surnageant de culture en condition inductrice. En effet, la chélation du calcium du milieu de culture induit la sécrétion de 5 protéines majoritaires par la souche parentale *CHA*  $\square$  ExoS, PopB, PopD et PcrV, (Dacheux et al., 2001 et figure III.4). On observe sur la figure III.4 que le mutant *CHAΔpopBD* est bien déficient en PopB et PopD mais qu'il sécrète les mêmes quantités d'ExoS et de PcrV que la souche sauvage. Ceci indique que la mutation de *popB* et *popD* que nous avons réalisée affecte spécifiquement les protéines PopB et PopD, et que le système de sécrétion est intact. De plus, la mutation réalisée n'affecte pas la régulation de la sécrétion des protéines du SSTT par le calcium (figure III.4).



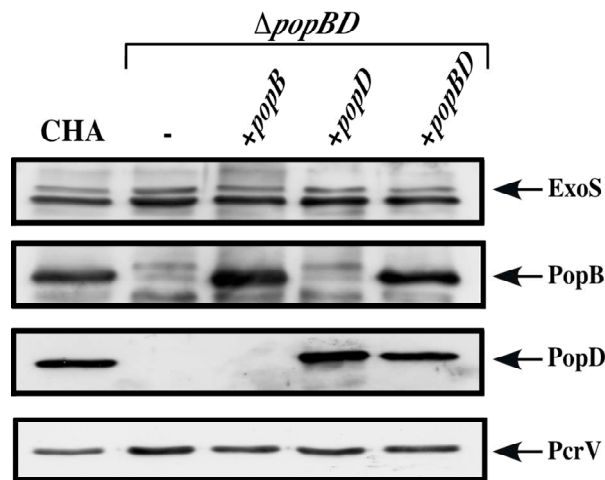


**Figure III.4.** Analyse par Western blot des protéines sécrétées dans le surnageant de culture de CHA et CHA $\Delta$ popBD, en condition non inductrice (-) (LB) et inductrice (+) (LB, EGTA 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM).

Des fractions de 25  $\mu$ l de surnageants ont été séparées par SDS-PAGE 12%, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose et analysées par Western blot, en utilisant les anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV (1/3000<sup>ème</sup>) et anti-PopB (1/5000<sup>ème</sup>), ainsi que le sérum polyclonal anti-PopD (1/1000<sup>ème</sup>).

Des complémentations en *trans* du mutant CHA $\Delta$ popBD ont été réalisées avec des constructions plasmidiques portant soit *popB*, soit *popD*, soit ces deux gènes. Les gènes utilisés pour ces constructions ont été amplifiés par PCR, avec une ADN polymérase hautement fidèle, puis séquencés et clonés sous le contrôle du promoteur natif de l'opéron, *ppcrG*, dans un vecteur dérivé de pUCP20 (tableau II.1, Matériels et Méthodes). Les complémentations par les plasmides portant respectivement soit *popB*, soit *popD*, nous ont permis d'obtenir des souches isogéniques déficientes respectivement pour PopD et pour PopB.

Nous avons contrôlé l'expression et la sécrétion des protéines codées par ces différents plasmides dans le mutant CHA $\Delta$ popBD. Pour cela, nous avons analysé par Western blot, les protéines sécrétées par le SSTT dans le surnageant de culture des différentes souches complémentées, en condition inductrice. Ces analyses montrent que les protéines PopB et PopD, apportées en *trans* dans CHA $\Delta$ popBD, sont exprimées et sécrétées (figure III.5).



**Figure III.5. Vérification des complémentations de CHA $\Delta$ popBD.**

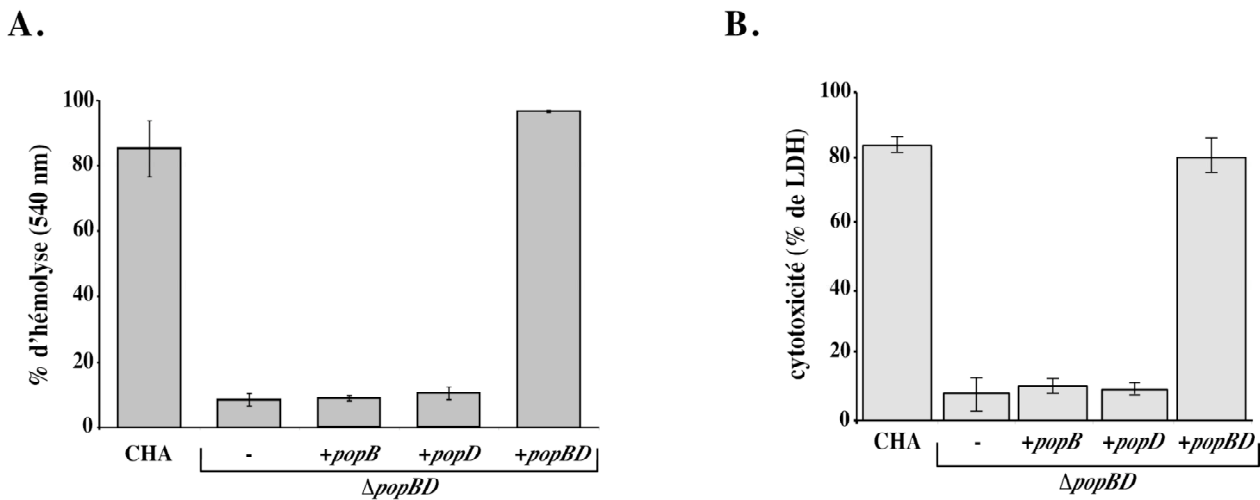
Analyse par Western blot des protéines sécrétées par les différentes souches indiquées, dans des conditions inductrices pour la sécrétion du SSTT. Des fractions de 25  $\mu$ l de surnageants ont été séparées par SDS-PAGE 12%, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose et analysées par Western blot.

### 3.B- PopB et PopD sont essentielles à l'activité formatrice de pores

Afin d'étudier l'activité formatrice de pores SSTT-dépendante de ces trois souches mutantes, nous avons testé la capacité de ces dernières à induire la lyse de macrophages et de globules rouges (figure III.6).

Contrairement à la souche parentale CHA, le mutant CHA $\Delta$ popBD ne lyse qu'environ 10% des hématies en 1 h d'infection (figure III.6A). L'activité hémolytique de ce mutant est similaire à l'hémolyse induite par le mutant CHA-D1, déficient pour ExsA (figure III.1). On note également sur la figure III.6A, que les bactéries qui sécrètent les paires de protéines PopB/PcrV (CHA $\Delta$ popBD/popB) ou PopD/PcrV (CHA $\Delta$ popBD/popD) sont incapables de lyser les globules rouges et donc d'induire la formation de pores dans les membranes de ces cellules. Seule la complémentation par le plasmide portant les deux gènes, *popB* et *popD*, permet de restaurer l'activité hémolytique de la souche CHA (figure III.6A).

Sur la figure III.6B, on observe que le mutant CHA $\Delta$ popBD est également incapable de lyser les macrophages et que seule, la complémentation *in trans* par les deux gènes, *popB* et *popD*, restaure la cytotoxicité envers les macrophages.



**Figure III.6. Activité hémolytique et cytotoxique.**

**A.** Activité hémolytique des différentes souches. Des GRM sont infectés par les souches indiquées sur la figure pendant 1h à 37°C, à une MOI de 1. L'hémolyse est évaluée par la mesure du relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection par spectrophotométrie à 540 nm.

**B.** Activité cytotoxique envers les macrophages. Les macrophages J774 sont infectés par les souches indiquées pendant 2 h à 37°C, à une MOI de 10. La cytotoxicité est évaluée par la mesure de l'activité LDH relarguée dans le surnageant d'infection.

En parallèle, la capacité de chacune de ces souches à transloquer des effecteurs cytotoxiques (Exo) dans les cellules eucaryotes a été étudiée dans le laboratoire (Goure *et al.*, 2004). Pour cette expérience, des fibroblastes NIH 3T3 qui expriment constitutivement la GFP fusionnée à l'actine- $\beta$  (3T3/GFA) ont été utilisés (Scaife *et al.*, 2003). Les effecteurs ExoS et ExoT possèdent une activité RhoGAP. L'introduction de ces effecteurs dans le cytoplasme des fibroblastes 3T3/GFA entraîne donc une réorganisation du cytosquelette d'actine et des modifications de la morphologie de la cellule qui peuvent être visualisées *in vivo* par microscopie à fluorescence durant l'infection. Deux heures après avoir été infectées par la souche CHA, les cellules 3T3/GFA présentent des perturbations du réseau d'actine, observables par la formation d'agrégats d'actine-GFP qui présentent une fluorescence intense. Le double mutant, qui sécrète uniquement la protéine PcrV, est incapable d'induire des perturbations du cytosquelette d'actine des cellules 3T3/GFA. Seule, la complémentation par les deux gènes, *popB* et *popD*, restaure l'activité de translocation des effecteurs cytotoxiques de la souche CHA.

On observe une bonne corrélation des résultats obtenus avec les trois modèles d'infection cellulaire. Ceci suggère donc que les pores qui provoquent la lyse des GRM et des macrophages sont les mêmes que ceux qui permettent la translocation des effecteurs à travers les membranes des cellules eucaryotes.

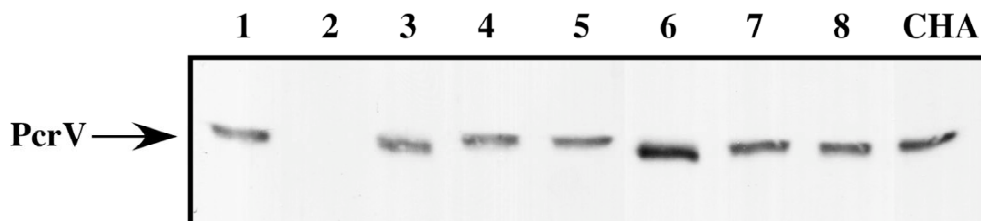
## 4- Rôle de PcrV dans l'hémolyse

### 4.A- Caractérisation de la souche isogénique $\Delta$ PcrV

Nous venons de montrer qu'une souche, qui exprime et sécrète PcrV en l'absence de PopB et PopD, est incapable d'induire la formation de pore dans les membranes de GRM. Afin d'étudier la participation de PcrV dans la formation de ces pores, j'ai construit à partir de la souche CHA, un mutant non polaire et non marqué déficient pour PcrV.

La stratégie de mutagenèse utilisée pour construire ce mutant est similaire à celle utilisée pour la construction du mutant  $CHA\Delta popBD$ . Une double recombinaison homologue m'a permis de réaliser un échange allélique entre le gène *pcrV* chromosomique et un plasmide contenant une délétion interne dans *pcrV*.

La sélection des doubles recombinants est réalisée grâce au marqueur de contre-sélection *sacB*. Les doubles recombinants qui ne synthétisent pas la protéine PcrV *in vitro* sont criblés par Western blot à l'aide de l'anticorps purifié anti-PcrV (figure III.7). Sur huit doubles recombinants testés, seul  $CHA\Delta pcrV$  (piste 2) est déficient pour PcrV.

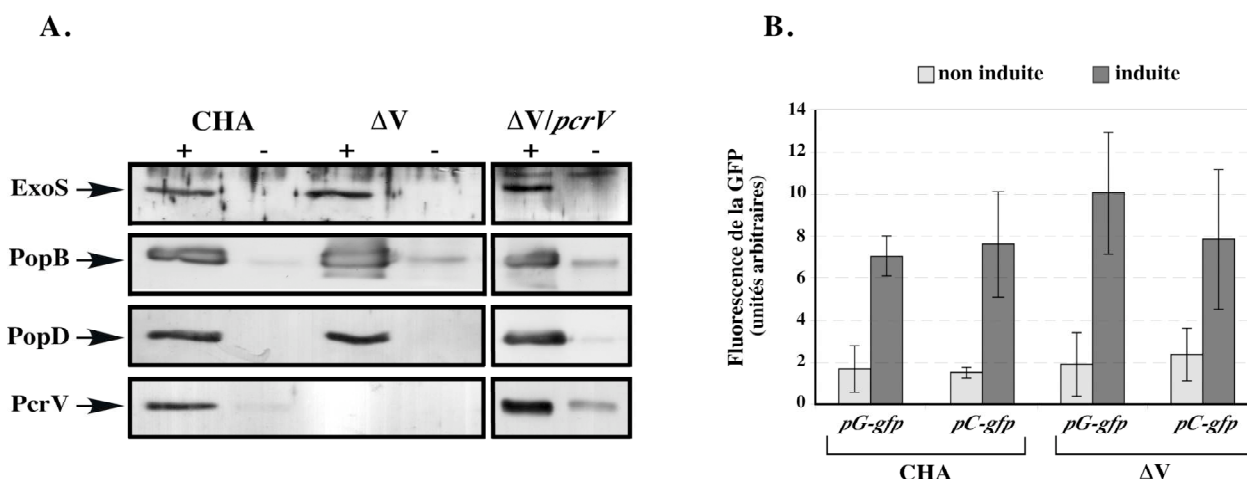


**Figure III.7. Criblage du mutant  $CHA\Delta pcrV$  par Western blot.**

Les différents doubles recombinants ainsi que la souche parentale CHA, ont été cultivés en condition inductrice pour le SSTT. Des fractions de 20  $\mu$ l des cultures induites ont été séparées par SDS-PAGE 12%, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose et analysées par Western blot à l'aide d'anticorps purifiés anti-PcrV.

#### 4.B- L'activité formatrice de pores requiert PcrV

Tout d'abord, le profil de sécrétion de la souche parentale CHA et du mutant CHA $\Delta$ *pcrV* ont été comparés. Ces deux souches ont été cultivées en milieu LB dans des conditions inductrices (+) et non inductrices (-) pour la sécrétion par le SSTT. Les surnageants de culture obtenus ont été analysés par Western blot (figure III.8A). On observe sur cette figure que les protéines ExoS, PopB et PopD sont retrouvées en quantités similaires dans les surnageants des deux souches. PcrV n'est donc pas nécessaire à la sécrétion des protéines PopB et PopD. On peut également constater que l'absence de PcrV n'affecte pas la régulation de la sécrétion du SSTT par le calcium, puisque l'effecteur ExoS ainsi que PopB et PopD sont sécrétés uniquement lorsque la culture bactérienne est réalisée en condition inductrice (figure III.8A). Cependant, de récentes études ont montré que la sécrétion des protéines du SSTT était insensible au calcium dans un mutant déficient en PcrV (McCaw *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 1999). Afin d'étudier le profil de régulation du SSTT dans notre mutant  $\Delta$ V, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle des promoteurs du SSTT, *pexsC* et *ppcrG*, dans CHA et  $\Delta$ V. Pour cela, les plasmides pIApC et pIApG, qui portent respectivement les fusions transcriptionnelles *pexsC-gfp* et *ppcrG-gfp* ont été introduits dans CHA et  $\Delta$ V. La synthèse de la GFP a été évaluée au Fluor Imager, dans les cultures bactériennes en conditions inductrice et non inductrice. Quelles que soient les conditions de culture, le niveau d'expression de la GFP mesuré avec les promoteurs *pexsC* et *ppcrG*, dans la souche déficiente pour PcrV, est similaire au niveau mesuré dans la souche parentale CHA avec les mêmes promoteurs (figure III.8B). La protéine PcrV n'est donc pas impliquée dans la régulation de l'expression et de la sécrétion des protéines du SSTT.

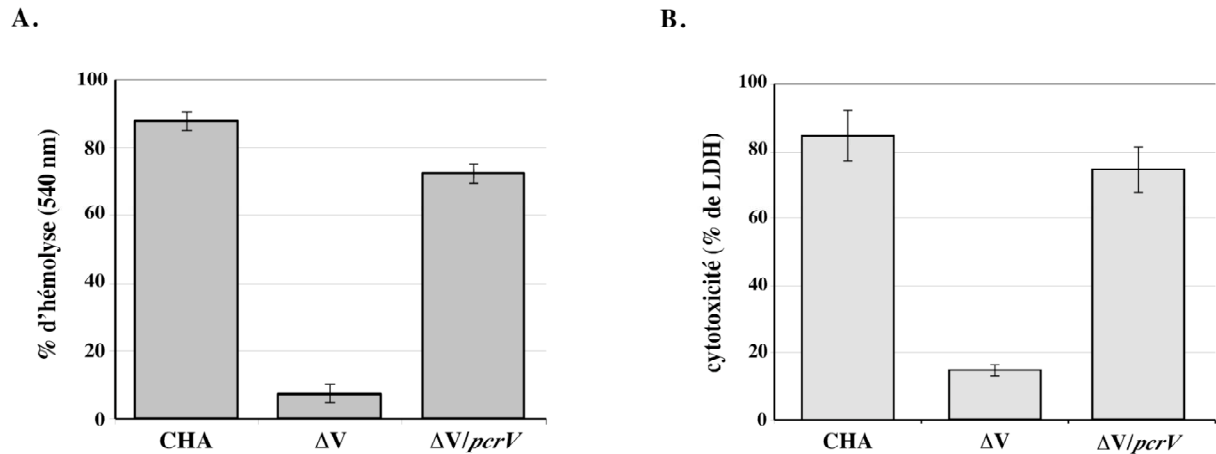


**Figure III.8. Étude de la sécrétion et de la régulation du SSTT dans le mutant *PcrV*.**

**A.** Comparaison des profils de sécrétion de CHA,  $\Delta V$  et de la souche complétement  $\Delta V/pcrV$ . Les souches sont cultivées en condition inductrice (+) et non inductrice (-). 40  $\mu$ l des différents surnageants de culture sont analysés par Western blot à l'aide des anticorps anti-ExoS, anti-PopB, anti-PopD et anti-PcrV.

**B.** Activité transcriptionnelle des promoteurs du SSTT, *pexsC* et *ppcrG*, dans CHA et  $\Delta V$ . Les fusions transcriptionnelles *pexsC-gfp* et *ppcrG-gfp*, portées respectivement par les plasmides pIApC et pIApG ont été introduites par électroporation dans CHA et  $\Delta V$ . Les activités transcriptionnelles de ces promoteurs ont été mesurées en condition inductrice et non inductrice au FluorImager. La fluorescence de la GFP est présentée en unités arbitraires.

L'activité formatrice de pores type III-dépendante de ce mutant et sa capacité à transloquer les effecteurs cytotoxiques (Exo) dans les cellules eucaryotes ont été étudiées. Sur la figure III.9, on peut voir que ce mutant est non-hémolytique et non-cytotoxique envers les macrophages. De plus, il est incapable de transloquer les effecteurs dans les fibroblastes 3T3/GFA (Goure *et al.*, 2004). Ces résultats montrent donc que la sécrétion des protéines PopB et PopD, seules, ne suffit pas à induire la formation de pores fonctionnels. L'activité formatrice de pores requiert donc également la sécrétion de PcrV, ce qui confirme les résultats de deux précédentes études qui montraient que PcrV était nécessaire à la cytotoxicité ExoS et ExoU dépendante de *P. aeruginosa* (Sawa *et al.*, 1999; Sundin *et al.*, 2002). La complémentation de ce mutant, par le gène sauvage *pcrV* sous le contrôle du promoteur *ppcrG*, restaure l'hémolyse et la cytotoxicité envers les macrophages (figure III.9), ainsi que la translocation des effecteurs à un niveau semblable à celui de la souche parentale (Goure *et al.*, 2004).

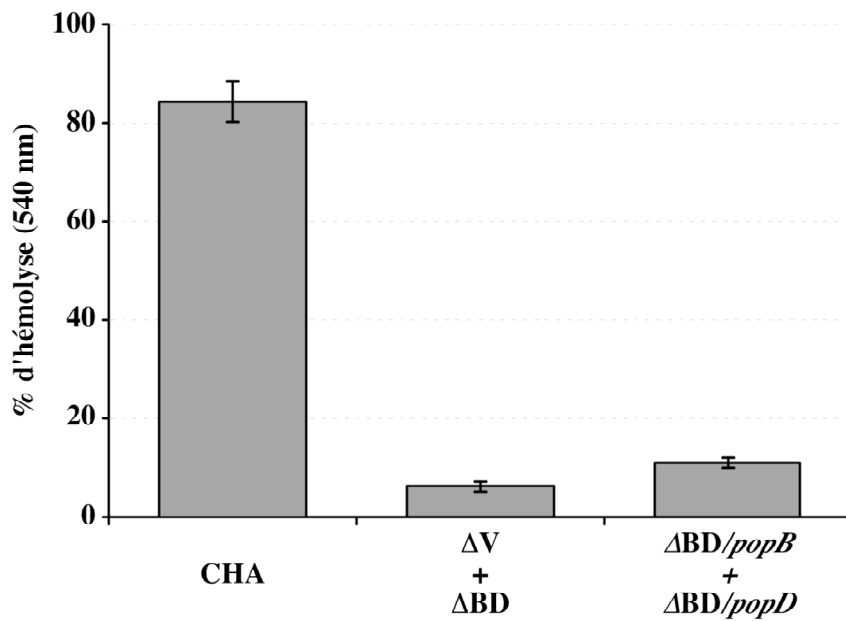


**Figure III.9. Le mutant CHAΔV est incapable de former des pores SSTT-dépendants.**

**A.** Activité hémolytique. Des GRM sont infectés par les souches indiquées sur la figure pendant 1h à 37°C, à une MOI de 1.

**B.** Activité cytotoxique envers les macrophages. Les macrophages J774 sont infectés par les mêmes souches, pendant 2 h à 37°C, à une MOI de 10.

Par ailleurs, la co-infection de GRM par les souches mutantes CHAΔBD et CHAΔV, ainsi que par les souches déficientes respectivement pour PopB (CHAΔBD/popD) et pour PopD (CHAΔBD/popB), n'entraîne pas la lyse des GRM (figure III.10). Les protéines PcrV, PopB et PopD doivent donc être sécrétées ensemble par la même bactérie pour induire la formation de pores fonctionnels dans les membranes d'hématies.



**Figure III.10.** L'activité formatrice de pores requiert une origine bactérienne commune de *PcrV*, *PopB* et *PopD*.

Des GRM sont co-infectés par les souches indiquées sur la figure pendant 1h à 37°C, à une MOI de 1. L'hémolyse est évaluée par la mesure du relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection par spectrophotométrie à 540 nm.

Ce travail fait l'objet de la première partie de l'Article 2: Goure J., Pastor A., Faudry E., Chabert J., Dessen A. et Attree I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/D translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.*, **72**(8), 4741-4750 (Annexe 2).



## 5- Discussion

Les travaux présentés dans ce chapitre m'ont permis de démontrer que le SSTT de *P. aeruginosa* induit la formation de pores dans les membranes des cellules eucaryotes. Ces pores nécessitent la présence des trois protéines sécrétées, PcrV, PopB et PopD, qui sont codées par l'opéron de translocation *pcrGVHpopBD*. Nous avons utilisé trois modèles d'infection cellulaire: les hématies de moutons et des macrophages afin d'évaluer l'activité formatrice de pores type III-dépendante et des fibroblastes, 3T3/GFA, qui expriment constitutivement l'actine- $\beta$  fusionnée à la GFP afin de suivre l'efficacité de la translocation des effecteurs. Ces trois modèles d'infection cellulaires présentent une corrélation correcte, ce qui suggère que les pores responsables de la lyse des GRM et des macrophages sont les mêmes que ceux qui permettent la translocation des effecteurs dans les cellules épithéliales (fibroblastes).

Les protéines PcrV, PopB et PopD, présentent un niveau d'homologie élevé avec leurs homologues respectifs chez *Yersinia* spp., LcrV, YopB et YopD, notamment au niveau des domaines conservés. De plus, de nombreuses études ont montré que LcrV, YopB et YopD étaient essentielles à la formation du pore qui permet le passage des effecteurs à travers la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote (Cornelis et Van Gijsegem, 2000; Holmström *et al.*, 2001; Neyt et Cornelis, 1999a; Nordfelth et Wolf-Watz, 2001; Tardy *et al.*, 1999). Ainsi, ces comparaisons laissent penser que PcrV, PopB et PopD sont les composants majeurs du pore de translocation chez *P. aeruginosa*.

L'assemblage du pore de translocation qui permet le passage des effecteurs dans le cytosol de la cellule eucaryote, nécessite la sécrétion, par la même bactérie, des protéines, PcrV, PopB et PopD. En effet, les co-infections de GRM par des souches sécrétant les protéines PopB/PopD et PcrV ou PopB/ PcrV et PopD/PcrV, n'induisent pas la formation de pores et de ce fait, aucun effecteur ne peut être transloqué. Comme il l'a été suggéré chez *Yersinia* (Marenne *et al.*, 2003), la formation de pores PopB/D par le SSTT de *P. aeruginosa* nécessitent probablement une concentration élevée de PcrV, PopB et PopD aux points focaux d'adhésion à la surface de la membrane eucaryote.

Néanmoins, de récents travaux que nous avons réalisés en collaboration avec l'équipe d'Andréa Dessen (IBS, Institut de Biologie Structurale) montrent qu'*in vitro*, les protéines recombinantes purifiées PopB et PopD sont individuellement capables de s'insérer et de former des structures en forme d'anneau, dans des membranes artificielles qui induisent la

lyse des liposomes (Schoehn *et al.*, 2003). Les protéines PopB et PopD possèdent donc chacune, *in vitro*, une activité formatrice de pores. Cependant, *in vivo*, je n'ai observé aucune activité formatrice de pores pour ces deux protéines. En effet, les mutants isogéniques  $\Delta popB$  et  $\Delta popD$  sont incapables de lyser les hématies et les macrophages. Cette activité formatrice de pores, des protéines PopB et PopD, observée *in vitro* pourrait s'expliquer par des différences au niveau de la composition et/ou de la rigidité des membranes des liposomes par rapport aux membranes des hématies et des macrophages. De plus, les quantités importantes de protéines purifiées utilisées pour les expériences *in vitro* (150  $\mu$ g), pourraient exacerber l'activité formatrice de pores de ces protéines.

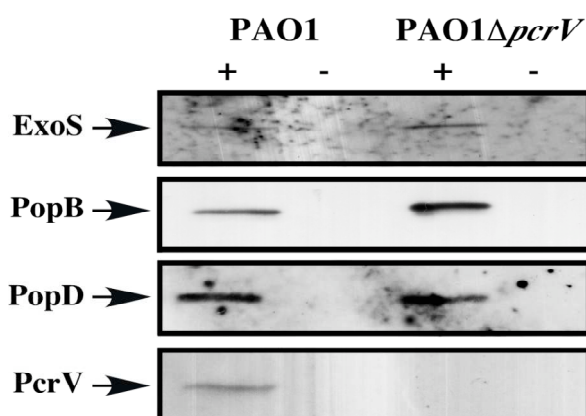
La réalisation d'expériences d'osmoprotection m'ont permis d'estimer que la taille des pores insérés par *P. aeruginosa* dans les membranes est comprise entre 28 et 35 Å. Ces pores sont donc de taille similaire aux pores YopB-dépendant formés par *Y. pseudotuberculosis* (comprise entre 12 et 35 Å) (Hakansson *et al.*, 1996), ainsi qu'au pore de translocation IpaB/C de *S. flexneri* dont le diamètre a été estimé à 26 Å  $\pm$  0.4 (Blocker *et al.*, 1999). La taille du pore de translocation YopB/D, inséré dans des liposomes infectés par *Y. enterocolitica*, a été estimée entre 16 et 23 Å (Neyt et Cornelis, 1999a). Cependant, contrairement à *P. aeruginosa*, une souche de *Y. enterocolitica* qui synthétise les différentes protéines effectrices est incapable d'induire une lyse significative des hématies. Par contre, une souche de *Y. enterocolitica* polymutante pour les effecteurs possède une importante activité hémolytique type III dépendante (Hakansson *et al.*, 1996; Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999b). Il a donc été suggéré que le pore de translocation de *Yersinia* serait obstrué par les protéines effectrices à transloquer, ce qui préviendrait la lyse par choc osmotique des macrophages et des hématies (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a). Cependant, Viboud et Bliska (2001) ont suggéré que l'absence d'activité hémolytique de la souche sauvage de *Y. enterocolitica* serait plutôt liée à l'effecteur YopE, puisque que la dépolymérisation de l'actine, induite par l'activité RhoGAP de YopE, empêche la formation des pores de translocation dans les membranes des cellules eucaryotes. En outre, de récents travaux de Marenne *et al.* (2003) montrent que l'activité RhoGAP de YopE empêche le relargage de LDH des macrophages mais pas celui du BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5 (et 6) carboxyfluoréscéine, acétoxyméthyl ester) qui est une petite molécule fluorescente de 623 Da, imperméable aux membranes après clivage par des estérases intracellulaires (Bhakdi

*et al.*, 1989). Ceci renforce l'hypothèse d'une obstruction du pore de translocation par le trafic des effecteurs Yops.

Plusieurs études ont montré que YopD participe à la régulation négative de la synthèse des protéines Yops (Francis et Wolf-Watz, 1998; Williams et Straley, 1998). Dans ce travail, les analyses du double mutant *CHAΔpopBD* et des souches isogéniques déficientes uniquement pour PopB ou pour PopD, n'ont pas révélé de différences des niveaux d'expression et de sécrétion des protéines ExoS et PcrV par rapport à la souche sauvage. Les protéines PopB et PopD n'interviennent donc pas dans la régulation de l'expression et de la sécrétion des protéines du SSTT. De plus, il a été montré que la complémentation *en trans* d'un mutant *yopD*, par les gènes *popD* ou *pcrHpopD*, ne permet pas de restaurer la translocation des effecteurs dans le cytosol des cellules HeLa (Bröms *et al.*, 2003a). Ainsi, nous pouvons supposer que ces deux protéines homologues, essentielles au processus de translocation dans leur SSTT, ont soit un fonctionnement différent, soit qu'elles nécessitent des interactions avec des protéines spécifiques de leur SSTT. En effet, l'analyse bio-informatique des séquences protéiques de PopD de *P. aeruginosa* et de YopD de *Y. pseudotuberculosis* (figure III.13) avec le programme COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) prédit la présence d'un domaine d'interaction protéine-protéine de type «**Coiled-coil**» uniquement dans YopD.

La construction d'un mutant  $\Delta$ PcrV non-polaire m'a également permis d'étudier la fonction de cette protéine dans la régulation de la sécrétion du SSTT *P. aeruginosa*. Il a été attribué à PcrV, une fonction de régulateur négatif de la sécrétion de type III, puisque que la délétion de *pcrV* entraîne une dérégulation de la sécrétion des protéines du SSTT, laquelle perd alors sa sensibilité au calcium (McCaw *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 1999). Cependant, l'analyse du profil de sécrétion de notre mutant *CHAΔpcrV*, en condition inductrice et non inductrice, montre que l'effecteur ExoS ainsi que les protéines PopB et PopD, sont sécrétés uniquement en absence de calcium et en même quantité que par la souche parentale CHA. Ces résultats confirment l'étude de Sundin *et al.* (2002), selon laquelle PcrV n'est pas un régulateur négatif de la sécrétion des protéines du SSTT et remettent en question le rôle de régulateur négatif de PcrV. Afin de confirmer le phénotype de notre mutant *CHAΔpcrV*, j'ai réalisé une mutation identique du gène *pcrV* dans la souche de référence PAO1. Sur la figure III.11, on peut observer que ce mutant PAO1 $\Delta$ *pcrV* possède le même phénotype que

CHA $\Delta$ *pcrV* ou que le mutant *pcrV* de la souche PAK (Sundin *et al.*, 2002). Cette différence de phénotypes pourrait être dépendante des souches utilisées ou des conditions de culture. En effet, la souche PA103, utilisée par McCaw et Sawa, sécrète les effecteurs ExoU et ExoT alors que, les souches CHA, PAO1 et PAK sécrètent ExoS et ExoT. De plus, l'étude de l'activité transcriptionnelle des promoteurs du SSTT, *pexsC* et *ppcrG*, dans notre mutant  $\Delta V$  et dans la souche parentale en conditions inductrices et non inductrices, démontre que PcrV n'est pas impliquée dans la régulation transcriptionnelle du SSTT.







**Figure III.11. Comparaison des profils de sécrétion de PAO1 et de PAO1 $\Delta$ *pcrV*.**

Les souches sont cultivées dans des conditions inductrices (+) et non inductrices (-). 40  $\mu$ l des différents surnageants de culture sont analysés par Western blot à l'aide des anticorps anti-ExoS, anti-PopB, anti-PopD et anti-PcrV.

Matson et Nilles (2001) ont montré que la protéine LcrV de *Yersinia* spp. joue un rôle central dans le mécanisme de régulation de la sécrétion du SSTT. Le modèle proposé suggère que la formation de complexes LcrV:LcrG, dans les conditions inductrices pour la sécrétion, permet de libérer le canal de sécrétion bouché par LcrG. En outre, des travaux réalisés en collaboration avec l'équipe de A. Dessen (IBS), ont permis de montrer que PcrG et PcrV interagissent *in vitro* (Nanao *et al.*, 2003). De plus, ces dernières sont capables de compléter la synthèse et la sécrétion des protéines Yops dans respectivement, les mutants *lcrG* et *lcrV* (Matson et Nilles, 2002; Pettersson *et al.*, 1999). Cependant, nous avons montré que l'inactivation de *pcrV*, comme celle de *pcrG* (Sundin, 2003) n'affecte pas la régulation de la sécrétion du SSTT de *P. aeruginosa* par le calcium. Ces résultats laissent donc penser que

le complexe PcrG:PcrV existe dans *P. aeruginosa*, mais que son rôle est différent de celui joué par le complexe LcrG:LcrV dans la régulation de la sécrétion du SSTT de *Yersinia* spp.

Les homologues de PopB et PopD chez *Yersinia* spp., à savoir YopB et YopD, sont considérés comme les composants membranaires du translocon. En effet, ces protéines sont retrouvées associées aux liposomes, après infection de ces derniers par *Yersinia* (Tardy *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que ces deux protéines sont associées ensemble avec leur chaperone LcrH (ou SycD) dans le cytosol bactérien (Neyt et Cornelis, 1999b). Il a donc été suggéré par l'équipe du Pr. G. Cornelis, que YopB et YopD sont sécrétées sous forme d'hétérocomplexes et que la polymérisation de ces hétérocomplexes YopB/D, dans la membrane de la cellule eucaryote, forme le pore de translocation de *Yersinia* (Neyt et Cornelis, 1999a; Neyt et Cornelis, 1999b).

Les deux protéines translocatrices PopB et PopD sont essentielles à l'activité formatrice de pores type III-dépendante. L'analyse bio-informatique de la séquence protéique de PopB avec les programmes d'analyse statistique TM-PRED et COILS prédit respectivement la présence de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires, dans la région centrale de cette protéine, entre les acides aminés 171 à 191 et 235 à 259 et de deux motifs de type «oiled-coil entre les résidus 107 à 174 et 331 à 375 (figure III.12) (Schoehn *et al.*, 2003). YopB, l'homologue de PopB chez *Yersinia* spp., (43 % d'identité) présente des caractéristiques structurales similaires. Ces domaines «oiled-coil sont connus pour leur implication dans les interactions protéine-protéine, notamment dans l'assemblage de complexes macromoléculaires comme le flagelle et le pili de type IV (Lupas, 1996; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1997; Parge *et al.*, 1995).

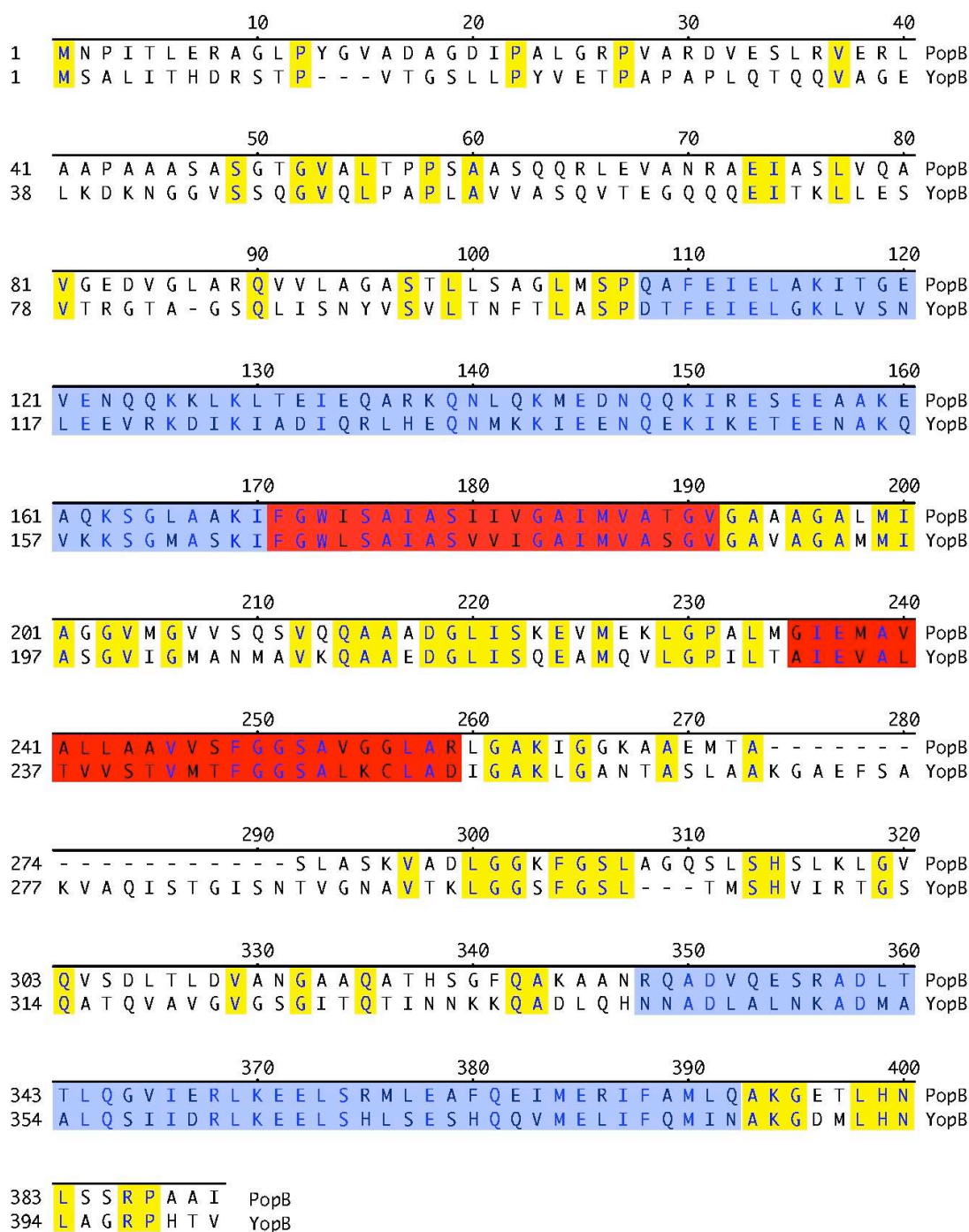
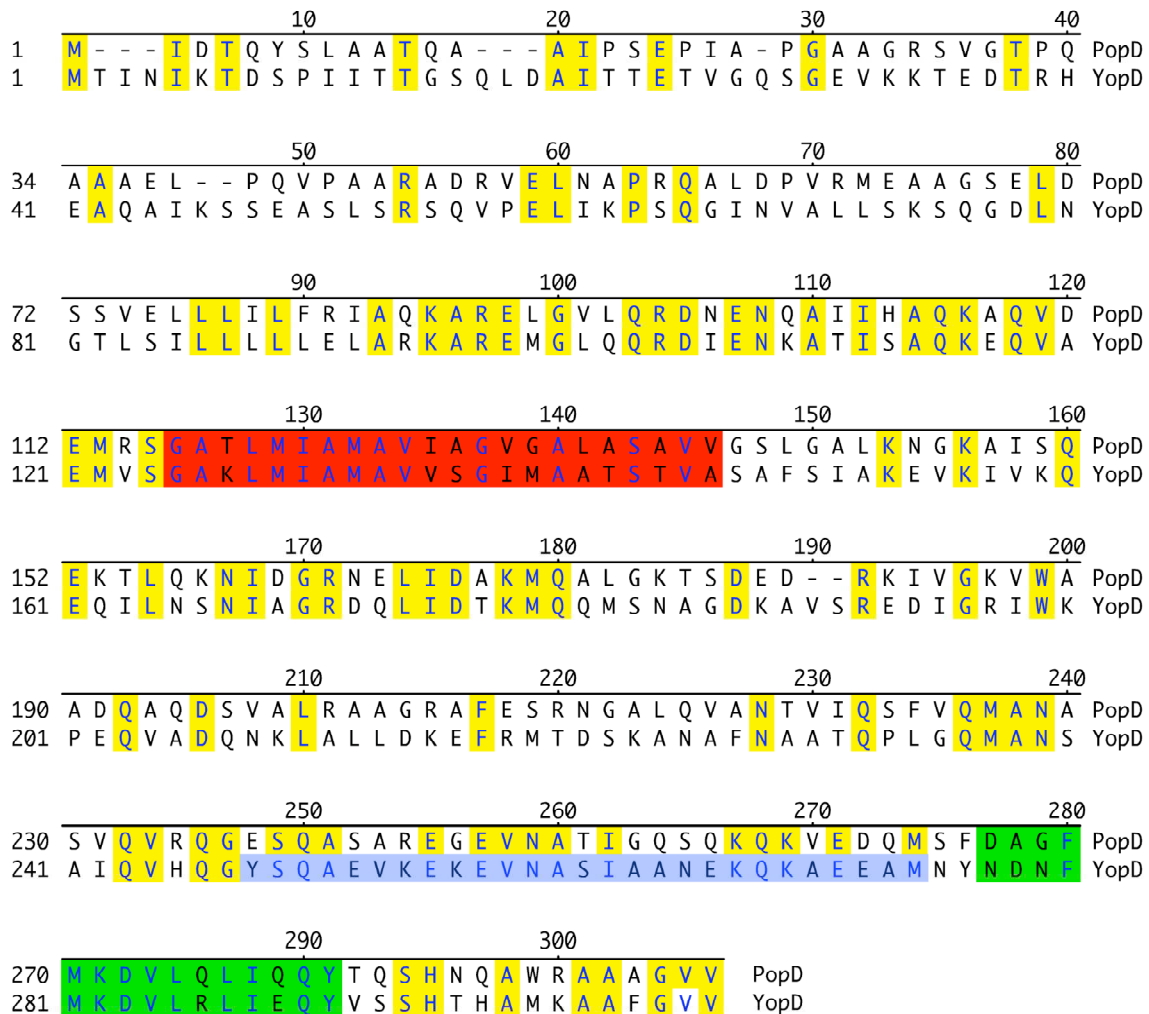



Figure III.12. Alignement des séquences protéiques de PopB de *P. aeruginosa* et de YopB de *Y. pseudotuberculosis*.

L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme Clustal W. Les résidus identiques sont indiqués en bleu (qu'ils soient sur fond jaune ou non). Les régions transmembranaires prédites par le programme TM-PRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) sont indiquées par un fond rouge. Les motifs «coiled-coil» prédits par le programme COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) sont représentés par un fond bleu.

La protéine PopD, comme son homologue YopD chez *Yersinia* spp., possède un domaine transmembranaire putatif en hélice  $\alpha$  entre les acides aminés 116 à 137, ainsi qu'un domaine en une hélice  $\alpha$  amphiphile en C-terminal entre les résidus 267 à 281 (Figure III.13) (Schoehn *et al.*, 2003).



**Figure III.13. Alignement des séquences protéiques de PopD de *P. aeruginosa* et de YopD de *Y. pseudotuberculosis*.**

L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme Clustal W. Les résidus identiques sont indiqués en bleu (qu'ils soient sur fond jaune ou non). La région transmembranaire prédite par le programme TM-PRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) est représenté par un fond rouge et l'hélice  $\alpha$  amphiphile est indiquée par un fond vert. Le motif «coiled-coil» prédit par le programme COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) est représenté par un fond bleu.

Ces caractéristiques de PopB et PopD laissent supposer que ces protéines peuvent s'insérer dans les membranes cytoplasmiques des cellules cibles et ainsi former le pore de translocation. De plus, on observe que le mutant CHA $\Delta$ *pcrV*, qui sécrète *in vitro* PopB et PopD, est incapable d'une part de transloquer les effecteurs dans le cytosol des cellules eucaryotes et d'autre part, de lyser les macrophages et les globules rouges. L'antigène V pourrait donc intervenir dans le mécanisme d'assemblage du pore de translocation dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote cible. Afin de tester ces deux hypothèses, j'ai recherché la présence des protéines PcrV, PopB et PopD dans les membranes de GRM infectés par les différentes souches de *P. aeruginosa*.





## **CHAPITRE IV**

### **ASSEMBLAGE DU PORE DE TRANSLOCATION**



## 1- Introduction

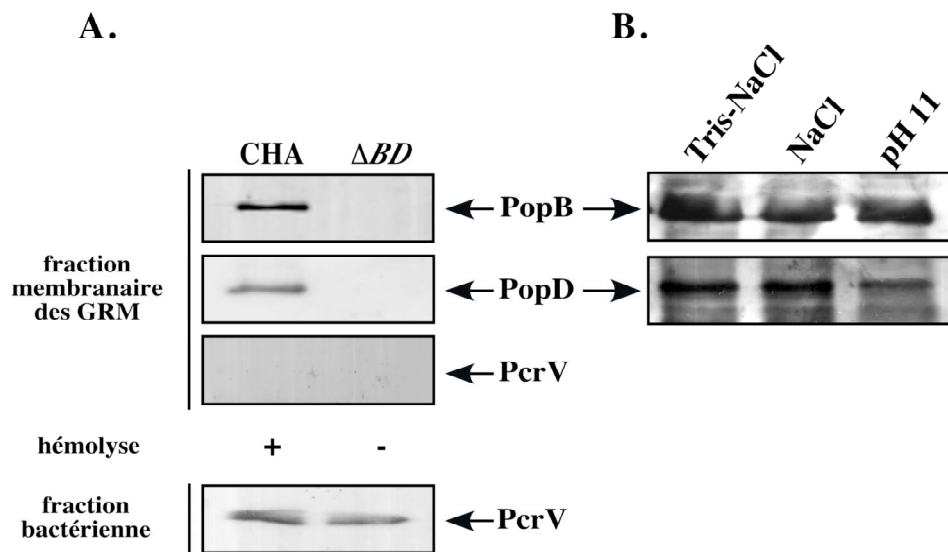
Dans le chapitre précédent, j'ai démontré que chacune des protéines, PcrV, PopB et PopD sont essentielles à la formation du pore de translocation, responsable de la lyse des macrophages et des globules rouges. Les analyses bio-informatiques de la structure secondaire de ces trois protéines laissent supposer que PopB et PopD peuvent s'insérer dans les membranes des cellules eucaryotes cibles. Afin de vérifier cette hypothèse et d'étudier le rôle de PcrV dans l'assemblage de ce pore, j'ai recherché la présence de ces protéines dans les membranes de cellules eucaryotes infectées par la souche CHA et par les différentes souches mutantes de *P. aeruginosa*. Pour cela, j'ai utilisé le modèle d'infection cellulaire érythrocyte/*P. aeruginosa* développé dans le chapitre précédent. Ensuite, les membranes d'érythrocytes infectés ont été isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu, puis analysées par Western blot.

## 2- Insertion des protéines translocatrices PopB et PopD dans les membranes d'hématies

J'ai donc choisi d'utiliser le modèle d'infection érythrocytes/*P. aeruginosa* pour étudier la présence des protéines PcrV, PopB et PopD dans les membranes de cellules eucaryotes infectées. Ce système minimal permet d'obtenir une importante activité cytotoxique type III-dépendante, à une MOI faible (MOI de 1) et dans un temps assez court (une heure d'infection). De plus, les globules rouges de moutons (GRM) sont des cellules disponibles en grand nombre à un prix très raisonnable et les membranes de GRM infectés par *P. aeruginosa* peuvent être assez facilement isolées sans contamination bactérienne.

J'ai tout d'abord recherché la présence des protéines PcrV, PopB et PopD dans les membranes isolées de GRM infectés par la souche sauvage CHA ou par le mutant CHA $\Delta$ popBD.

On observe, sur la figure IV.1A, que les protéines translocatrices PopB et PopD sont retrouvées en quantité significative dans les membranes d'hématies infectées par la souche parentale CHA, alors que PcrV n'est jamais retrouvée associée aux membranes de GRM.



**Figure IV.1. Insertion des protéines PopB et PopD dans les membranes d'hématies infectées par CHA.**

(A) Les GRM ont été infectés par les différentes souches de *P. aeruginosa* indiquées sur la figure, à une MOI de 1, pendant 1 h à 37°C. L'hémolyse a été mesurée pour chaque infection. Le signe (+) signifie que l'hémolyse mesurée est supérieure à 70% et le signe (-) signifie qu'elle est inférieure à 20%. Les membranes infectées ont été isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu, puis concentrées par ultracentrifugation.

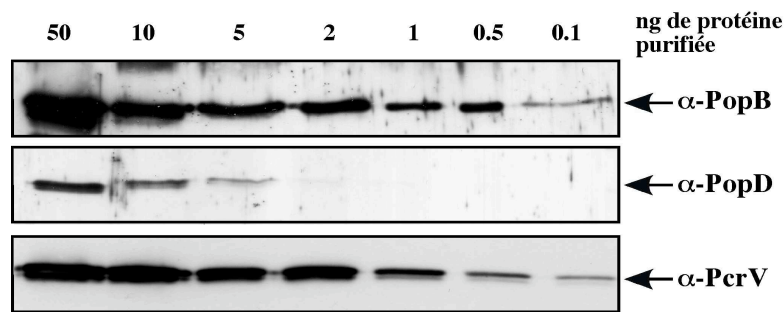
(B) Détermination du type d'association de PopB et PopD aux membranes d'hématies. Les membranes de GRM infectés par CHA $\Delta popBD/popBD$  sont isolées, puis incubées pendant 1 h à 4°C, en Tris salin, ou en Tris salin contenant 5 M de NaCl ou 0,2 M de carbonate pH 11,0. Les protéines présentes dans le culot membranaire ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées en Western blot à l'aide des anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV (1/3000<sup>ème</sup>), anti-PopB (1/5000<sup>ème</sup>), et du sérum polyclonal anti-PopD (1/1000<sup>ème</sup>).

Des échantillons de membranes de GRM infectés par les différentes souches bactériennes ont été observés en microscopie électronique à transmission, après avoir été colorés négativement (paragraphe 4 de ce chapitre). Aucune bactérie n'a été observée en MET dans ces échantillons. Les protéines retrouvées dans les fractions membranaires de GRM infectés ne proviennent donc pas de bactéries contaminantes présentes dans les échantillons de membranes.

Le type d'association des protéines PopB et PopD avec les membranes d'hématies a été étudié à partir de membranes isolées de GRM infectés par *CHAΔBD/popBD*. Ces membranes ont été traitées avec des concentrations élevées en sels (NaCl 5M) ou à pH alcalin ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M, pH 11,0), traitements connus pour détacher les protéines membranaires périphériques associées aux membranes, via respectivement des interactions électrostatiques ou hydrophiles. On observe sur la figure IV.1B, qu'après ces traitements, la majorité des protéines PopB et PopD reste associée aux membranes des GRM.

Cette forte association de PopB et PopD aux membranes des GRM, ainsi que la prédiction de domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$  dans ces protéines translocatrices suggèrent fortement que ces protéines sont insérées dans les membranes des GRM.

Sur la figure IV.2, on observe que les anticorps anti-PcrV et anti-PopB, utilisés aux mêmes dilutions que dans les Western blots présentés dans les figures IV.1, IV.3 et IV.4, ont un seuil de détection comparable. L'absence systématique de PcrV dans la fraction membranaire d'hématies infectées par la souche parentale CHA n'est donc pas due à une faible affinité des anticorps anti-PcrV utilisés. Par ailleurs, on peut noter sur cette même figure que le sérum polyclonal anti-PopD possède un seuil de détection environ 50 fois moins élevé que les anticorps polyclonaux purifiés anti-PopB. La purification du sérum polyclonal anti-PopD par chromatographie d'affinité ne m'a pas permis d'obtenir une fraction purifiée possédant un seuil de détection plus élevé. Ainsi, afin de compenser partiellement cette faible affinité du sérum polyclonal anti-PopD pour son antigène, j'ai systématiquement déposé deux fois plus de membranes isolées de GRM infectés sur les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) destinés à la recherche de PopD par Western blot.

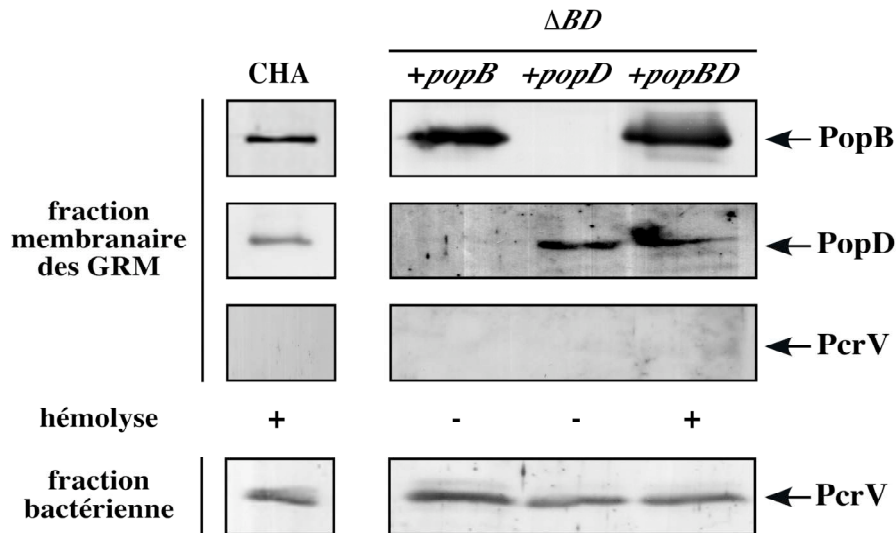


**Figure IV.2. Comparaison de l'affinité des anticorps anti-PopB, anti-PopD et anti-PcrV.**

Le seuil de détection de ces trois anticorps est comparé en Western blot à l'aide des protéines recombinantes PopB, PopD et PcrV purifiées. Les anticorps sont utilisés aux mêmes dilutions que dans la figure précédente.

Par ailleurs, j'ai réalisé des expériences similaires de fractionnement d'hématies infectées par les souches isogéniques de CHA déficientes pour PopB ou PopD (figure IV.3). On observe sur cette figure, que PopB est insérée dans les membranes de GRM en l'absence de PopD ( $\Delta BD/popB$ ) et inversement, que l'absence de PopB ( $\Delta BD/popD$ ) n'affecte pas l'insertion de PopD dans les membranes d'hématies. Les quantités de protéines PopB et PopD, qui sont insérées dans les membranes de GRM infectés par les souches complémentées  $CHA\Delta BD/popB$ ,  $CHA\Delta BD/popD$  et  $CHA\Delta BD/popBD$ , sont beaucoup plus importantes que les quantités de PopB et PopD retrouvées dans les membranes de GRM infectés par la souche parentale CHA (figure IV.3). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les complémentations du mutant  $CHA\Delta popBD$  sont réalisées avec un plasmide dit « $\square$  nombre moyen de copies $\square$ ». Cela signifie que chaque souche est complémentée par une dizaine de plasmides, ainsi ces souches possèdent une dizaine de copies des gènes *popB* et/ou *popD* alors que la souche parentale n'en possède qu'une.

On peut également remarquer que l'unique insertion de PopB ou PopD dans les membranes d'hématies, n'induit pas la formation de pores provoquant la lyse (figure IV.3).

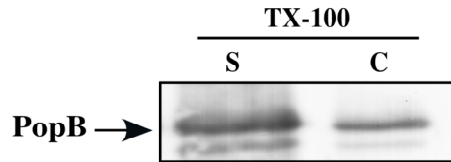


**Figure IV.3. Isolement des membranes de GRM infectées par les mutants  $\Delta B$  et  $\Delta D$ .**

Les GRM ont été infectés par les quatre souches indiquées sur la figure, à une MOI de 1, pendant 1 h à 37°C. L'hémolyse a été mesurée pour chaque infection. Le signe (+) signifie que l'hémolyse mesurée est supérieure à 70% et le signe (-) signifie qu'elle est inférieure à 20%. Les membranes infectées ont été isolées, puis concentrées par ultracentrifugation. Les protéines présentes dans le culot membranaire ont été séparées par SDS-PAGE, puis analysées en Western blot.

Le détergent non-ionique Triton X-100 (TX-100) est utilisé pour solubiliser les protéines membranaires intégrales. L'insolubilité au TX-100 1% à basse température est l'une des caractéristiques biochimiques des protéines associées aux micro-domaines membranaires riches en sphingomyéline et cholestérol, également appelé radeaux lipidiques. Des résultats préliminaires montrent qu'une proportion significative de protéines PopB insérées dans les membranes de GRM n'est pas solubilisée par le traitement au TX-100 (figure IV.4). Ce résultat suggère qu'une quantité significative de PopB s'accumule au niveau des radeaux lipidiques de la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote. Toutefois, la validation de ces résultats nécessite la réalisation de contrôles avec des protéines membranaires intégrales, localisées au niveau des radeaux lipidiques comme la cavéoline-1 et la calnexine.





**Figure IV.4. Accumulation de PopB dans la fraction insoluble au TX-100.**

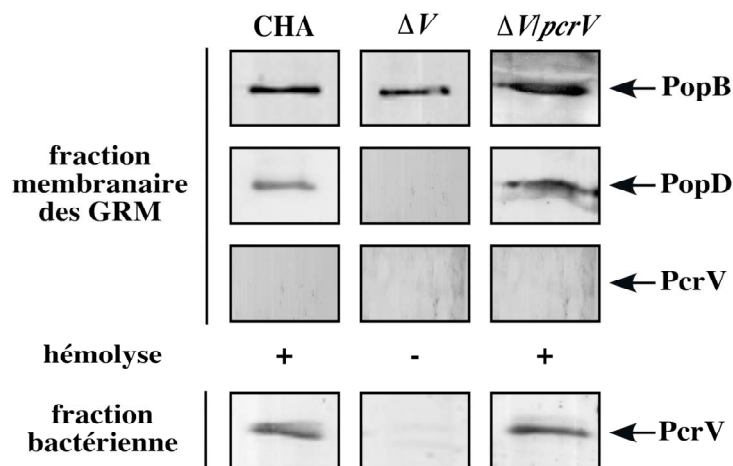
Les membranes de GRM infectés par *CHA $\Delta$ BD/popBD* sont isolées, concentrées puis incubées pendant 30 min à 4°C avec remise en suspension, en Tris salin 1% Triton X-100 (TX-100). La fraction insoluble (C) est séparée par ultracentrifugation du matériel soluble (S), puis la protéine PopB est recherchée dans ces deux fractions par Western blot.

Ces résultats permettent de conclure que la partie membranaire du translocon, insérée dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes cibles, est composée des protéines PopB et PopD.

### **3- Rôle de PcrV dans l'assemblage de pores de translocation fonctionnels dans les membranes de GRM**

Nous avons démontré précédemment que la protéine PcrV n'est pas insérée dans les membranes d'hématies infectées par CHA mais que, cependant, cette protéine est essentielle à l'activité formatrice de pore type III-dépendante. Afin d'étudier la fonction de cette protéine dans la formation de ces pores, les protéines translocatrices PopB et PopD ont été recherchées dans les membranes isolées d'hématies infectées par le mutant *CHA $\Delta$ pcrV* (figure IV.5). On observe sur cette figure que seule la protéine PopB est retrouvée dans la fraction membranaire de GRM infectés par le mutant *pcrV* ( $\Delta V$ ) (figure IV.5). La protéine PcrV n'est donc pas nécessaire à l'insertion de PopB dans les membranes des hématies. Par contre, PcrV est essentielle à l'insertion de PopD dans les membranes des GRM, puisque la complémentation du mutant  *$\Delta$ pcrV* ( *$\Delta V$ /pcrV*) restaure l'insertion de PopD dans les membranes d'hématies (figure IV.5). La protéine PcrV est donc requise pour l'insertion et/ou la stabilisation de PopD dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. Ces résultats permettent d'attribuer à PcrV une fonction dans l'assemblage du pore PopB/D.

La co-infection de GRM par les mutants isogéniques CHA $\Delta$ B et CHA $\Delta$ D n'induit pas de lyse de ces cellules. Or, les protéines translocatrices PopB et PopD, qui constituent la partie membranaire du pore de translocation, sont insérées dans les membranes de ces GRM. Ces résultats suggèrent que la formation de pores de translocation PopB/D, dans les membranes des cellules eucaryotes, requiert des interactions entre les protéines PopB et PopD. De plus, il est probable que l'insertion de PopD dans les membranes de GRM nécessite une interaction de cette protéine PcrV. Ainsi, afin d'étudier les interactions entre PcrV, PopB et PopD au niveau membranaire, des expériences de co-immunoprécipitation sur des extraits de liposomes incubés avec les protéines recombinantes PcrV, PopB et PopD, ont été réalisées dans le laboratoire (Goure *et al.*, 2004). Cette technique nous a permis de mettre en évidence une interaction directe entre PopD et PopB en présence de liposomes. Cependant, aucune interaction entre PopD et PcrV ainsi qu'entre PopB et PcrV n'a pu être détectée (Goure *et al.*, 2004).



**Figure IV.5. Insertion de PopD dans les membranes de GRM requiert PcrV.**

Les GRM ont été infectés par les trois souches indiquées sur la figure, à une MOI de 1, pendant 1 h à 37°C. Le signe (+) signifie que l'hémolyse mesurée est supérieure à 70% et le signe (-) signifie qu'elle est inférieure à 20%. Les membranes infectées ont été isolées, puis concentrées par ultracentrifugation. Les protéines présentes dans le culot membranaire ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées en Western blot.

L'ensemble des résultats des paragraphes 2 et 3 de ce chapitre font l'objet de la seconde partie de l'Article 2: Goure J., Pastor A., Faudry E., Chabert J., Dessen A. et Attree I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/D translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.*, **72**(8), 4741-4750 (Annexe 2).

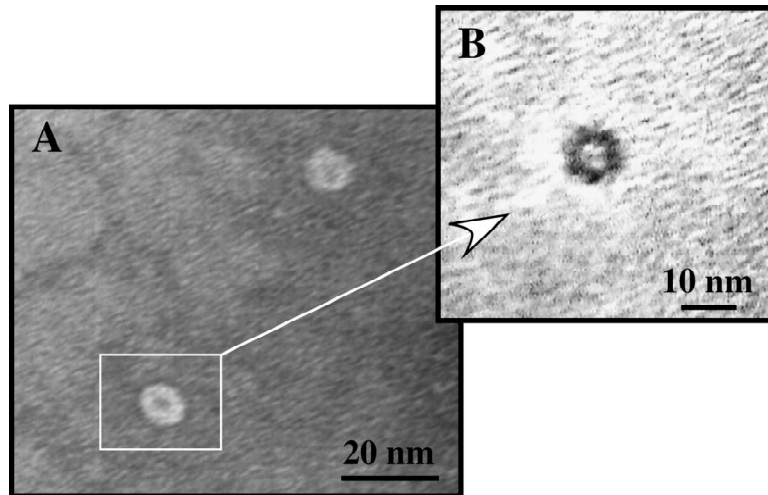
#### 4- Visualisation du pore de translocation

Nous avons également entrepris une collaboration avec Guy Brochier du service d'Imagerie et de Microscopie Electronique du CRSSA (Centre de Recherches du Service de Santé des Armées), afin de visualiser par microscopie électronique à transmission (MET) les pores insérés dans les membranes d'hématies infectées par la souche CHA.

La coloration négative à l'uranyle acétate de membranes de GRM infectés par la souche CHA, nous a permis de visualiser des structures en forme d'anneau, insérées dans les membranes des hématies (figure IV.6). Ces structures, de diamètre externe d'environ 102 Å ( $\pm 7$  Å) et interne d'environ 43 Å ( $\pm 3$  Å), ne sont pas retrouvées dans les membranes de GRM non-infectés ou infectés par les souches isogéniques déficientes pour PopB, PopD ou PcrV. Ces résultats préliminaires laissent penser que ces structures en forme d'anneau sont les pores de translocation du SSTT de *P. aeruginosa*.

Afin de confirmer l'identité des structures observées en coloration négative dans les membranes de GRM infectés par CHA, nous avons entrepris des expériences d'immunomicroscopie électronique. Pour cela, nous avons utilisé les anticorps polyclonaux purifiés anti-PopB et anti-PopD, et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or. Ces expériences ont été réalisées sur des membranes isolées de GRM infectés par CHA, CHA $\Delta$ BD et CHA $\Delta$ V, ainsi que sur des membranes de GRM non-infectés. Malheureusement, nous avons observé que les anticorps utilisés interagissent de façon non spécifique avec les membranes de GRM non-infectés (contrôle négatif). Ces anticorps ne sont donc pas suffisamment spécifiques pour être utilisés en immuno-microscopie. Nous avons donc entrepris la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre la forme oligomérique de

PopB et de PopD afin d'analyser par immuno-microscopie électronique les pores observés en coloration négative.







**Figure IV.6.** Images du pore de translocation du SST de *P. aeruginosa* par microscopie électronique dans les membranes de GRM infectés par CHA.

**A.** Coloration négative de membranes de GRM infectés par CHA. 5  $\mu$ l d'une solution de membrane d'hématies infectées par CHA ont été déposés pendant 3 minutes sur une grille de cuivre recouverte de Formvar et de carbone (Formvar-coated copper grid, 400 mesh, Agar Scientific). L'excès de liquide est éliminé, puis la coloration négative a été réalisée par un bain de 10 secondes dans d'acétate d'uranyle 1%. Les échantillons ont été observés et photographiés avec un microscope électronique à transmission JEOL 1010, 80 kV.

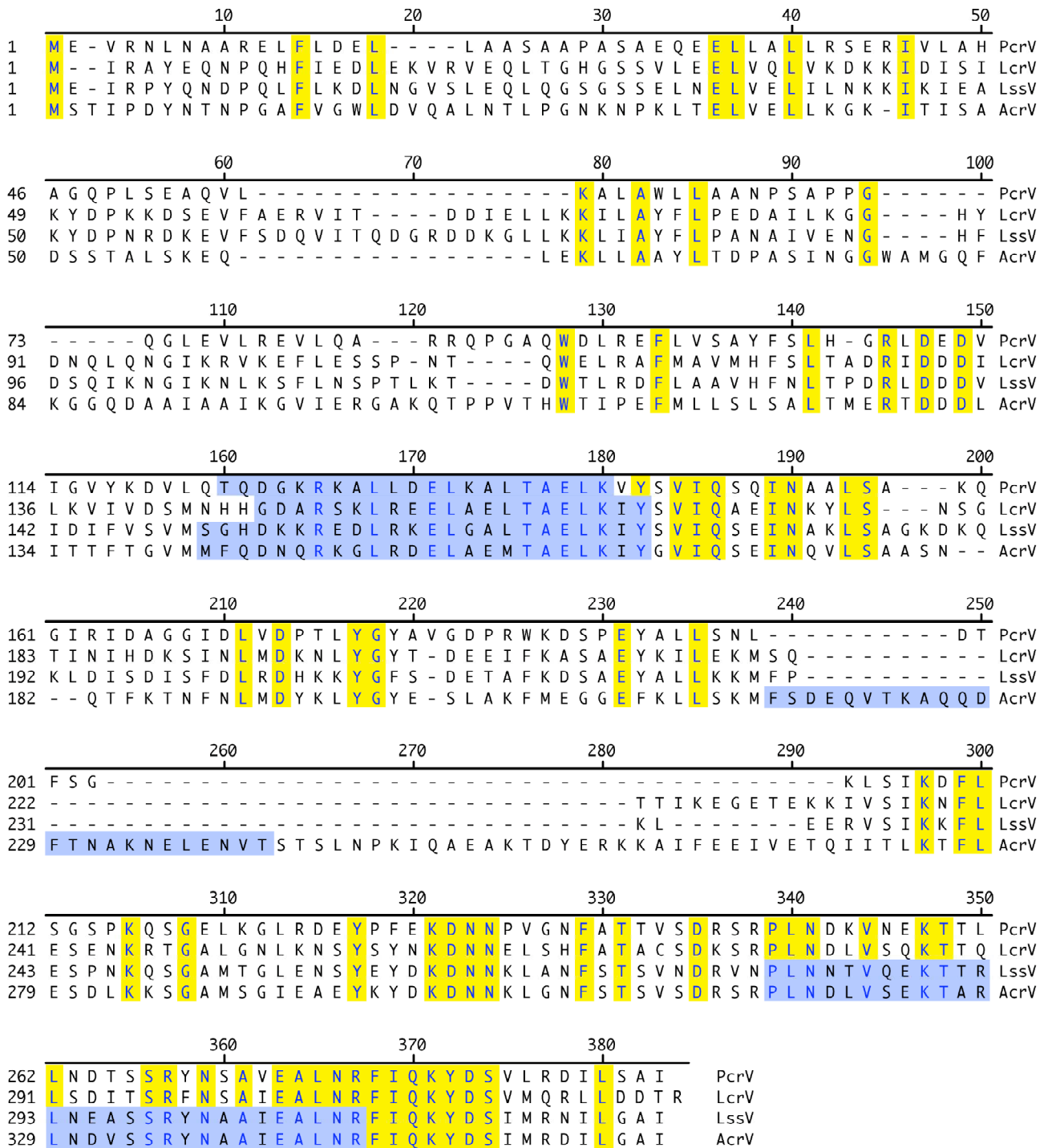
**B.** Photographie en négatif de l'image d'un pore numérisé avec le logiciel Samba Technologies IPS.

## 5- Discussion

Les expériences de fractionnement membranaire d'hématies infectées par la souche sauvage CHA de *P. aeruginosa* m'ont permis de mettre en évidence que seules les protéines PopB et PopD sont insérées dans les membranes d'hématies. Ces deux protéines constituent donc la partie membranaire du pore de translocation.

À ce jour, seuls les systèmes de sécrétion de type III de *Yersinia* spp. (LcrV), d'*Aeromonas hydrophila* (AcrV) (Burr *et al.*, 2003) et de *Photobacterium luminescens* (LssV) (Waterfield *et al.*, 2002) possèdent une protéine homologue à PcrV. Les SSTT d'*A. hydrophila* et de *P. luminescens* ont été identifiés suite au séquençage de ces deux génomes, par homologie avec le SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. (Burr *et al.*, 2002; Waterfield *et al.*, 2002). L'analyse bio-informatique de la séquence protéique de ces quatre homologues, avec le programme d'analyse statistique COILS, a prédit que les protéines, LssV et AcrV, possèderaient respectivement deux et trois domaines «coiled-coil», alors que PcrV et LcrV ne possèderaient qu'un seul de ces domaines dans leur région centrale (figure IV.7). Ces motifs «coiled-coil» sont des hélices  $\alpha$  amphiphiles, connues pour être impliquées dans des interactions protéine-protéine (Pallen *et al.*, 1997), notamment dans l'assemblage de complexes macromoléculaires (Lupas, 1996; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1997; Parge *et al.*, 1995).

On peut également observer sur la figure IV.7 que la région carboxy-terminale de ces protéines (résidus 251 à 286) est très conservée, ce qui suggère qu'elle pourrait coder pour une fonction ou une propriété commune à ces quatre antigènes V. Un BLAST, réalisé avec cette région ne m'a pas permis d'identifier de motifs particuliers dans cette séquence. Il serait donc intéressant de réaliser une mutagenèse de cette région afin d'étudier sa fonction.





**Figure IV.7. Alignement des séquences protéiques des trois homologues de PcrV. L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme Clustal W.**

Les résidus identiques sont représentés en bleu (qu'ils soient ou non sur fond jaune). Les motifs « $\square$ coiled-coil $\square$ » prédits avec le programme COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) sont représentés par un fond bleu.

Par ailleurs, l'analyse de la séquence protéique de ces quatre homologues que j'ai réalisée avec le programme TM-PRED ne prédit la présence d'aucune d'hélice  $\alpha$  transmembranaire dans ces protéines.

Néanmoins, en 2001, Holmström *et al.* ont montré que les protéines recombinantes PcrV et LcrV étaient capables de former des pores dans une bicouche lipidique artificielle. Ces auteurs ont proposé que PcrV, comme LcrV chez *Yersinia* spp., constitue le cœur du canal transmembranaire inséré dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote et que la région comprise entre les résidus 106 et 173 de PcrV, déterminerait la taille de ce canal (Holmström *et al.*, 2001). L'analyse de la structure tertiaire de cette région révèle une conformation en feuillets  $\beta$  amphiphiles (Holmström *et al.*, 2001) similaires aux domaines retrouvés dans d'autres protéines formatrices de pore, comme les porines et les cytolysines cholestérol-dépendante (CDC) (Jap et Walian, 1996). Cependant, dans toutes mes expériences de fractionnement de GRM infectés par la souche CHA, je n'ai jamais retrouvé la protéine PcrV dans la fraction membranaire. Ces observations concordent avec les résultats obtenus au cours de notre collaboration avec l'équipe d'Andréa Dessen (IBS) qui n'observe aucune association de la protéine recombinante PcrV aux liposomes (Schoehn *et al.*, 2003). Ces résultats remettent donc fortement en cause l'activité formatrice de pore de PcrV observée par Holmström *et al.* (2001). Toutefois, cette protéine est essentielle à la formation du pore de translocation (Goure *et al.*, 2004; Sawa *et al.*, 1999; Sundin *et al.*, 2002). Les expériences de fractionnement membranaire sur des GRM infectés par CHA et CHA $\Delta$ V, présentées dans ce chapitre, montrent que PcrV est requis pour l'insertion et/ou la stabilisation de PopD dans les membranes de GRM. La protéine PcrV intervient donc, *in vivo*, dans l'assemblage de pores de translocation fonctionnels, dans la membrane cytoplasmique de cellules eucaryotes, sans être associée à ces membranes.

Cette fonction de PcrV, ainsi que la prédiction d'un domaine d'interaction protéine-protéine de type «coiled-coil» dans la séquence protéique de cette protéine, suggèrent que PcrV interagit avec les protéines translocatrices PopD et PopB. Cependant, tout comme les techniques d'immuno-overlay (Allmond *et al.*, 2003) et de purification d'affinité (Schoehn *et al.*, 2003), les expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans le laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence ces interactions (Goure *et al.*, 2004). Il est possible que ces interactions soient transitoires ou trop labiles pour être détectées par les méthodes actuelles. Cependant, on peut également envisager que ces interactions soient indirectes et qu'elles fassent donc intervenir un ou plusieurs partenaires protéiques encore inconnus. Ces

partenaires bactériens pourraient être recherchés par purification d'affinité dans des lysats totaux d'infections «Bactérie-cellule hôte», à l'aide d'une colonne chargée de protéines PcrV. La réalisation de co-immunoprécipitation, avec des anticorps anti-PcrV sur des lysats totaux d'infections «Bactérie-cellule hôte», pourraient également conduire à l'identification de nouveaux partenaires bactériens ou eucaryotes de PcrV.

De plus, on pourrait également imaginer que PcrV fasse le lien entre l'aiguille de type III et le pore de translocation PopB/D. Il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre PscF qui est le composant majeur des aiguilles de type III chez *P. aeruginosa*, et la protéine PcrV.

Nous avons également démontré que PopB était capable de s'insérer dans les membranes de GRM en l'absence de PopD et inversement, que l'insertion de PopD dans les membranes de GRM ne nécessitait pas PopB. Cependant, l'insertion dans les membranes, soit de PopB, soit de PopD n'induit pas la formation de pores fonctionnels. En effet, les souches sécrétant les paires de protéines PopB/PcrV ou PopD/PcrV sont non hémolytiques. De la même façon, l'insertion de PopB et PopD dans les membranes des GRM, par des souches bactériennes différentes (co-infection par CHA $\Delta$ popBD/popB et CHA $\Delta$ popBD/popD) n'induit pas la formation de pores responsables de la lyse des GRM. Ceci signifie que les interactions entre PopB et PopD, mis en évidence dans les liposomes, sont essentielles à la formation de pores de translocation fonctionnels. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que le complexe macromoléculaire PopB/D, qui constitue le pore, est formé avant d'être inséré dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote.

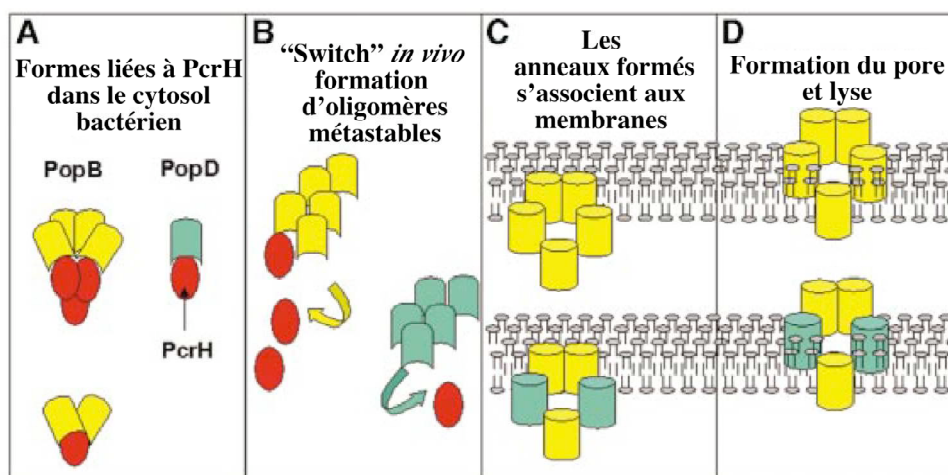
Les mécanismes qui mènent à la formation de pores par les différentes toxines bactériennes sont très discutés et deux modèles sont actuellement proposés. Tout d'abord, le modèle basé sur le mécanisme d'assemblage de la streptolysine O (SLO) proposé par Palmer *et al.* (1998) (Palmer *et al.*, 1998). Le pore formé par la SLO est de structure oligomérique et contient 50 à 80 sous-unités de SLO (Bhakdi *et al.*, 1985; Sekiya *et al.*, 1993). Ce modèle suggère que l'oligomérisation, permettant la formation du pore, ne se fait qu'après l'association des différentes sous-unités avec la membrane. À l'inverse, dans le second modèle, basé sur le mécanisme d'assemblage de la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, les sous-unités du pore s'assembleraient en une structure oligomérique métastable avant de s'associer à la membrane et de générer un pore (Shepard *et al.*, 1998).



Les travaux réalisés en collaboration avec l'équipe d'A. Dessen ont permis de proposer un modèle du mécanisme d'assemblage du tranlocon de type III de *P. aeruginosa* (Figure IV.8) (Schoehn *et al.*, 2003), qui ressemble à celui proposé par Tweten pour la pneumolysine (Shepard *et al.*, 1998; Tweten *et al.*, 2001).

Dans ce modèle, les protéines PcrH, PopB et PopD sont co-exprimées dans le cytoplasme bactérien, où des complexes hétérodimériques PcrH:PopD et hétéro-oligomériques PcrH:PopB se forment (Figure IV.8A). Ensuite, un signal, de nature indéterminée, entraînerait le relargage de PcrH, permettant ainsi aux protéines PopB et PopD d'acquérir leur conformation oligomérique métastable et «membrane-active» (Figure IV.8B). Dans leur conformation oligomérique, ces protéines reconnaissent la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes cibles, enrichie en radeaux lipidiques (Figure IV.8C). Ces oligomères s'insèrent, dans ces membranes, sous forme de complexes hétéromériques, ce qui génère des pores et provoque la lyse des cellules cibles (Figure IV.8D).

Cependant, ce modèle ne fait pas apparaître PcrV, protéine essentielle à la formation des pores de translocation. PcrV n'est probablement pas l'élément responsable du relargage de PcrH, puisque *in vitro* PcrV n'est pas capable d'induire le relargage de PcrH des complexes PcrH:PopD et PcrH:PopB (Schoehn *et al.*, 2003). De plus, aucune interaction n'a pu être encore mise en évidence entre PcrV et les protéines PopB et PopD (Allmond *et al.*, 2003; Goure *et al.*, 2004; Schoehn *et al.*, 2003).



**Figure IV.8.** Modèle du mécanisme de formation du pore de translocation de *P. aeruginosa* (d'après Schoehn *et al.*, 2003).

Les résultats que j'ai obtenus dans ce chapitre peuvent permettre d'intégrer PcrV dans ce modèle. La protéine PcrV, présente au sommet de l'aiguille, agirait comme une « chaperone extracellulaire » organisant la formation d'hétéro-oligomères PopB/D de 6 à 8 sous-unités. Ensuite ces hétéro-oligomères s'insèreraient avec l'aide de PcrV dans les membranes des cellules eucaryotes afin de former des pores hétéro-oligomériques PopB/D stables. Le contact entre l'aiguille et le pore se ferait par la protéine PcrV, probablement sous forme oligomérique.

Des résultats préliminaires sur l'insertion de PopB dans les membranes de GRM suggèrent qu'une quantité significative de protéines PopB insérées est accumulée au niveau des radeaux lipidiques de ces membranes eucaryotes. Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines enrichis en cholestérol, en céramides et en récepteurs, présents dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (Simons et Ikonen, 1997). Ces résultats préliminaires concordent avec les résultats obtenus *in vitro*, qui montrent que seuls les liposomes contenant du cholestérol sont lysés par les oligomères de PopB ou de PopD (Schoehn *et al.*, 2003). Cependant, l'absence de cholestérol dans les liposomes n'altère ni l'association de ces oligomères aux liposomes, ni la génération de structures en forme d'anneau à la surface des liposomes (Schoehn *et al.*, 2003). Le cholestérol serait donc uniquement essentiel à l'insertion des hétéro-oligomères PopB/D dans les membranes des cellules eucaryotes et par conséquent à la formation des pores de translocation. Ces résultats sont confirmés par les récents travaux de Van der Goot *et al.* (2004). En effet, ces travaux suggèrent que l'insertion, de l'homologue de PopB chez *S. flexneri*, IpaB, dans les membranes eucaryotes, requiert le cholestérol (Van Der Goot *et al.*, 2004). Un rôle semblable du cholestérol a déjà été observé dans l'activité formatrice de pores des cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC, cholesterol-dépendant cytolysins), comme la SLO. Chez ces CDC, le cholestérol est essentiel à l'insertion des barriques  $\beta$  transmembranaires de l'oligomère, dans la membrane de la cellule eucaryote cible.

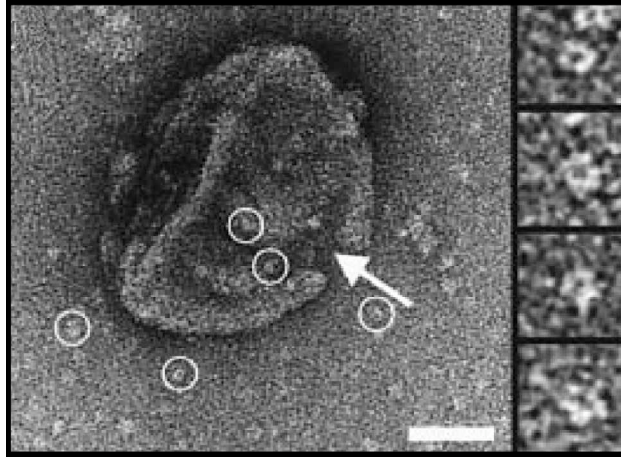
Par ailleurs, les radeaux lipidiques ont été décrits comme étant des sites préférentiels pour les interactions « Bactéries-cellules » (Manes *et al.*, 2003; Van Der Goot et Harder, 2001). Il a été établi que la cytotoxicité envers les cellules eucaryotes de *P. aeruginosa* et de *S. flexneri* requiert la présence de radeaux lipidiques (Grassme *et al.*, 2003; Lafont *et al.*, 2002; Simons et Toomre, 2000; Van Der Goot *et al.*, 2004). Il a été montré que l'interaction de IpaB avec le récepteur cellulaire CD44, présent au niveau des radeaux lipidiques des

membranes cytoplasmiques des cellules épithéliales, permet à *S. flexneri* d'infecter plus efficacement les cellules épithéliales (Lafont *et al.*, 2002; Skoudy *et al.*, 2000). Il est donc possible que les radeaux lipidiques contiennent des récepteurs aux protéines translocatrices de *P. aeruginosa*, récepteurs qui sont essentiels à l'infection des cellules eucaryotes.

L'utilisation de drogues comme la filipine, la nystatine ou la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, connues pour désorganiser les domaines membranaires riches en cholestérol, pourrait permettre d'évaluer l'importance des radeaux lipidiques dans la formation du pore de translocation de *P. aeruginosa*. De plus, afin de rechercher d'éventuelles protéines membranaires eucaryotes capables d'interagir avec PopB ou PopD, nous allons entreprendre des expériences de chromatographie d'affinité avec PopB et PopD oligomériques, sur des extraits totaux de cellules eucaryotes dont les protéines membranaires ont été marquées.

Des observations au MET, en coloration négative, de membranes de GRM non-infectés ou infectés par les différentes souches, nous ont permis de visualiser, dans les membranes de GRM infectés par la souche parentale CHA, des structures en forme d'anneau de diamètre externe de 102 Å ( $\pm 7$  Å) et interne de 43 Å ( $\pm 3$  Å). Les caractéristiques de ces structures sont assez proches des pores, de diamètre externe  $\approx 80$  Å et interne de 40 Å ( $\pm 3,5$  Å), qui sont formés dans les liposomes par les protéines purifiées PopB et PopD (figure IV.9) (Schoehn *et al.*, 2003). Ces similitudes nous laissent supposer que les structures que l'on a spécifiquement observées dans les membranes de GRM infectés par CHA, pourraient être les pores de translocation PopB/D du SSTT de *P. aeruginosa*. La réalisation d'expériences d'immuno-microscopie électronique avec des anticorps spécifiques des protéines PopB et PopD oligomériques pourrait nous permettre de confirmer cette hypothèse.

La numérisation et l'analyse, de nos photographies avec le logiciel Samba Technologies, révèlent que ces structures en forme d'anneau sont composées de 6 à 8 structures globulaires. Ces résultats suggèrent que le pore de translocation du SSTT de *P. aeruginosa* serait composé de 6 à 8 sous-unités. Cette structure hypothétique du pore de translocation du SSTT de *P. aeruginosa* est similaire à la structure segmentée en 6 à 8 sous-unités des supposés pores de translocation du SSTT d'EPEC caractérisés, par microscopie à force atomique dans des membranes d'hématies infectées par le surnageant de culture (Ide *et al.*, 2001). Il serait intéressant d'entreprendre des expériences de microscopie à force atomique sur les membranes de GRM infectés par la souche CHA.



**Figure IV.9.** Analyse par microscopie électronique en coloration négative des structures en forme d'anneau formées par PopB induisant la lyse des liposomes (d'après Schoehn *et al.*, 2003).

Comme chez *P. aeruginosa*, la composition du pore de translocation du SSTT de *Yersinia* spp., et la fonction de l'antigène V dans la formation de ce pore sont très discutées. Holmström *et al.* (2001) ont proposé que l'insertion de LcrV, dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote, initie la formation du pore et qu'ensuite, les protéines translocatrices, YopB et YopD, viennent stabiliser le pore afin de former un translocon fonctionnel. Cependant, il a été montré que seules les protéines YopB et YopD sont associées aux liposomes après infection de ceux-ci par *Yersinia* (Tardy *et al.*, 1999). Il a donc été suggéré par ces auteurs que la partie transmembranaire du pore de translocation serait composée par YopB et YopD (Tardy *et al.*, 1999). Nos résultats obtenus chez *P. aeruginosa* renforcent le modèle proposé ci-dessus. Une étude récente de Marenne *et al.* (2003) montre que l'absence de LcrV, dans un mutant poly-Yops (déficient pour tous les effecteurs Yop), n'affecte pas la sécrétion des translocateurs mais abolit l'activité formatrice de pores. De plus, même si elles ont été récemment contredites (Lee *et al.*, 2000), des interactions entre LcrV et les deux protéines translocatrices, YopB et YopD, ont été démontrées par Sarker *et al.* (1998). Ainsi, afin d'étudier la composition et l'incorporation du pore de translocation du SSTT de *Yersinia* dans les membranes d'hématies, nous avons entrepris une collaboration avec le laboratoire de G. Cornelis (Biozentrum, Basel).



**CHAPITRE V**  
**IMMUNOPROTECTION**



## 1- Introduction

L'antigène V est un composant clé de la translocation des effecteurs cytotoxiques du SSTT dans le cytosol des cellules eucaryotes, aussi bien chez *P. aeruginosa* que chez *Yersinia* spp. Dans le précédent chapitre, j'ai pu montrer que PcrV était indispensable à l'assemblage du pore de translocation du SSTT de *P. aeruginosa* dans les membranes des GRM. De plus, il a été montré que l'immunisation active avec l'antigène V, ainsi que l'immunisation passive avec des anticorps dirigé contre PcrV ou LcrV confèrent aux animaux modèles une protection efficace contre des infections à *P. aeruginosa* et à *Yersinia* spp. (Hill *et al.*, 1997; Lawton et Surgalla, 1963; Motin *et al.*, 1994; Roggenkamp *et al.*, 1997; Sawa *et al.*, 1999; Une et Brubaker, 1984). J'ai donc étudié dans ce chapitre quels sont les effets des anticorps protecteurs anti-PcrV sur l'assemblage du pore de translocation PopB/D dans les membranes de cellules eucaryotes.

Afin de répondre à cette question, j'ai tout d'abord testé la capacité des anticorps anti-PcrV et celle d'autres anticorps spécifiques de protéines du SSTT de *P. aeruginosa* (disponibles au laboratoire) à protéger les GRM de l'activité formatrice de pores de *P. aeruginosa*. Ensuite, afin d'étudier l'effet des anticorps protecteurs sur le pore de translocation inséré dans les membranes de GRM, j'ai réalisé des expériences de fractionnement de membranes de GRM infectés par la souche parentale en présence ou non de ces anticorps protecteurs.

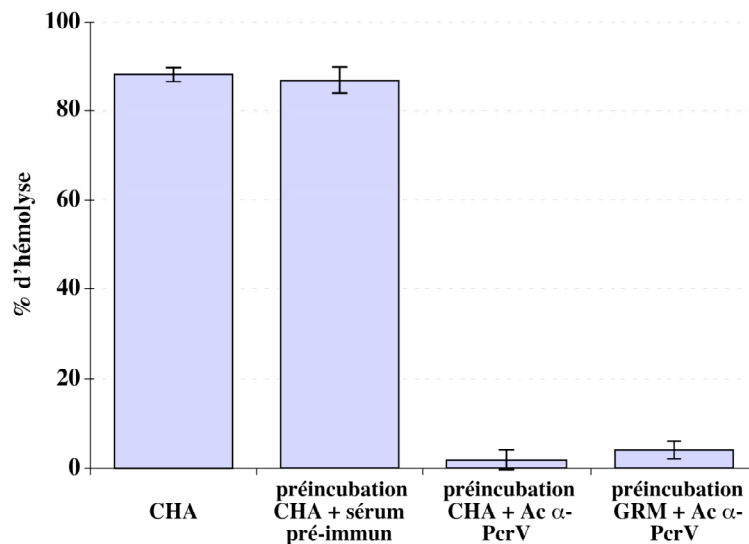
Par ailleurs, la collaboration réalisée avec le laboratoire du Pr. G. Cornelis, nous a permis d'étudier la composition et l'incorporation du pore de translocation de *Y. enterocolitica*, en utilisant comme modèle cellulaire les hématies.

## 2- Les anticorps anti-PcrV protègent les GRM de l'hémolyse SSTT-dépendante de *P. aeruginosa*

Il a été montré que les anticorps (Ac) polyclonaux purifiés anti-PcrV protègent les macrophages de la lyse induite par *P. aeruginosa* (Sawa *et al.*, 1999). Pour valider l'utilisation des hématies comme modèle cellulaire pour les expériences d'immunoprotection, j'ai effectué un test préliminaire avec les Ac anti-PcrV produits dans le laboratoire (figure V.1). Les anticorps anti-PcrV, à une concentration finale de 25 ng/μl, inhibent la quasi-totalité



de l'activité hémolytique type III-dépendante de *P. aeruginosa* alors que le sérum pré-immun n'a aucun effet sur cette activité hémolytique (figure V.1). Le niveau de protection des GRM est similaire que les anticorps protecteurs soient pré-incubés avec les bactéries ou avec les GRM (figure V.1).



**Figure V.1. Anticorps anti-PcrV protègent les GRM de l'hémolyse type III-dépendante de *P. aeruginosa*.**

Les bactéries ou les hématies sont pré-incubées pendant 45 minutes avec des anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV. Le test d'hémolyse est ensuite réalisé à une MOI de 1 et à une concentration finale de 25 ng d'anticorps/ $\mu$ l. Après 1 heure d'incubation à 37°C, l'hémolyse est évaluée en mesurant le relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection. Le contrôle négatif est réalisé en pré-incubant les bactéries avec du sérum pré-immun de lapin.

Afin de tester la capacité des anticorps spécifiques des protéines, PcrV, PopB et PopD, essentielles à l'activité formatrice de pores de *P. aeruginosa*, j'ai réalisé des expériences d'immunoprotection en utilisant des concentrations croissantes d'anticorps de 0,05 ng à 50 ng d'Ac/ $\mu$ l (figure V.2). Ces concentrations correspondent à une variation d'environ  $8 \cdot 10^2$  à  $8 \cdot 10^5$  du rapport « nombre d'anticorps par bactérie ». Ces expériences sont réalisées dans des microplaques 96 puits, à une MOI de 1. Les bactéries sont préalablement incubées avec les anticorps à tester pendant 45 minutes à température ambiante. L'infection est initiée par une centrifugation de 10 minutes à 1 500 g afin de favoriser le contact entre les bactéries et les

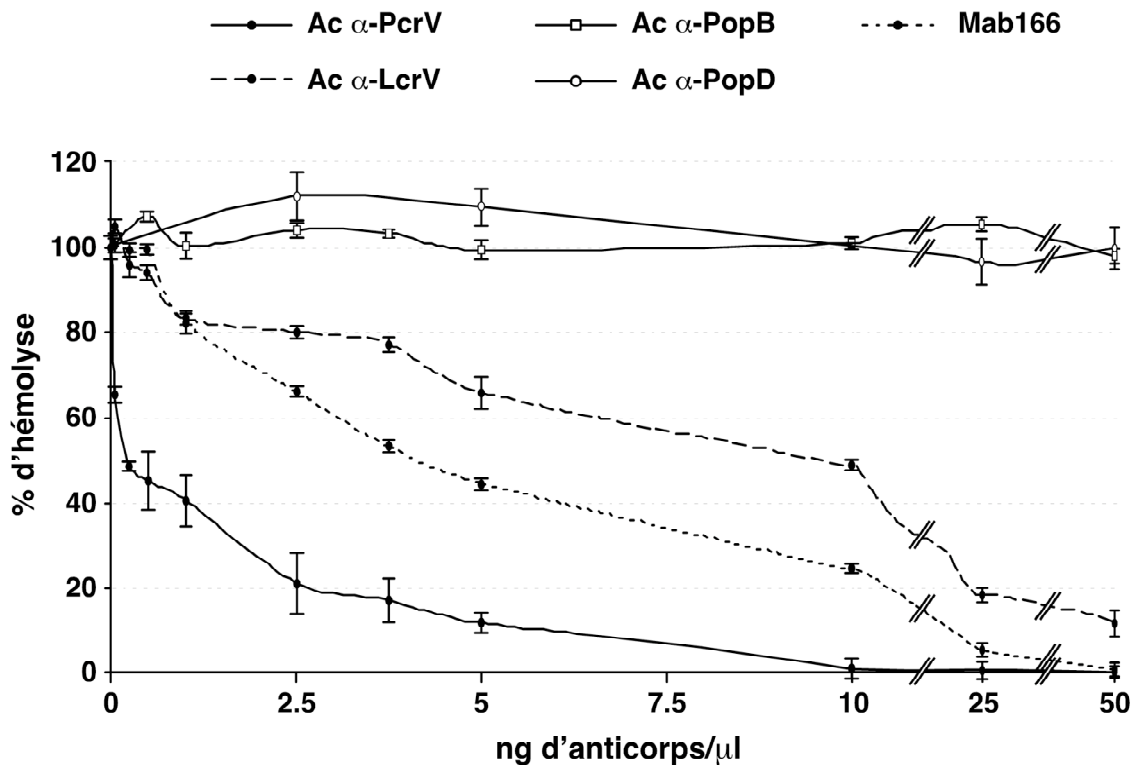
hématies. Après une heure d'incubation à 37°C, l'hémolyse est évaluée en mesurant par spectrophotométrie le relargage d'hémoglobine dans le surnageant d'infection. Les anticorps anti-PcrV, anti-PopB et anti-PopD ont été préalablement purifiés par chromatographie d'affinité à partir de sérums polyclonaux de lapin (cf. «Matériels et Méthodes», § 4C). Les anticorps polyclonaux de souris dirigés spécifiquement contre LcrV de *Y. pestis*, ont été produits et purifiés par le Dr. O. Attrée (CRSSA, La Tronche, France). L'anticorps monoclonal Mab166, généré et caractérisé par le Dr. D. Frank, reconnaît spécifiquement un large épitope de PcrV (résidus 158 à 217) (Frank *et al.*, 2002).

On observe sur la figure V.2 que des concentrations très faibles d'Ac polyclonaux purifiés anti-PcrV réduisent significativement l'activité hémolytique SSTT-dépendante de *P. aeruginosa*. En effet, ces anticorps à une concentration finale de 0,25 ng/μl induisent une diminution de 50% de l'activité hémolytique de *P. aeruginosa*. Au-delà de 10 ng/μl, soit un rapport anticorps par bactérie d'environ  $1,6 \cdot 10^5$ , ces anticorps confèrent aux GRM une protection quasi totale. Enfin, on peut voir qu'entre 0,05 et 10 ng/μl, l'inhibition de l'hémolyse induite par les anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV est dose dépendante (Figure V.2).

Il a été montré que l'anticorps monoclonal Mab166 protège les souris d'infections létales à *P. aeruginosa* (Frank *et al.*, 2002). On observe que cet anticorps inhibe, de façon dose dépendante, l'activité hémolytique de *P. aeruginosa* (figure V.2). À des concentrations supérieures à 25 ng/μl, l'anticorps Mab166 protège la quasi-totalité des GRM de l'hémolyse induite par le SSTT. Toutefois, cet anticorps est moins efficace que les anticorps polyclonaux anti-PcrV puisque l'inhibition de 50% de l'hémolyse nécessite environ 17 fois plus d'anticorps Mab166 (4,3 ng/μl) que d'anticorps polyclonaux (0,25 ng/μl) (figure V.2).

Les protéines LcrV de *Yersinia* spp. et PcrV de *P. aeruginosa*, qui présentent environ 41% d'identité au niveau des acides aminés (Yahr *et al.*, 1997), sont essentielles à la formation du pore de translocation (Bröms *et al.*, 2003c; Goure *et al.*, 2004; Pettersson *et al.*, 1999; Sarker *et al.*, 1998a; Sawa *et al.*, 1999; Sundin *et al.*, 2001). Ces deux protéines partagent probablement la même fonction dans l'assemblage de ce pore (Goure *et al.*, 2004). De la même façon que les Ac polyclonaux anti-PcrV et les Ac Mab166, les Ac polyclonaux spécifiques de LcrV de *Y. pestis* protègent les GRM de l'hémolyse induite par le SSTT de *P. aeruginosa* (figure V.2). Cependant, ces Ac anti-LcrV sont moins efficaces que les Ac anti-

PcrV puisqu'ils induisent une diminution de 50% de l'activité hémolytique à une concentration finale de 10 ng/μl, soit une concentration quarante fois supérieure à celle des Ac polyclonaux anti-PcrV (0,25 ng/μl) (figure V.2). La capacité des Ac polyclonaux anti-LcrV à protéger les GRM d'infections à *P. aeruginosa* suggèrent qu'il existe des épitopes protecteurs communs entre PcrV et LcrV.



**Figure V.2.** Effet dose dépendant de la protection conférée par les anticorps protecteurs.

La souche CHA de *P. aeruginosa* est pré-incubée pendant 45 minutes avec des quantités variables d'anticorps polyclonaux de lapin purifiés anti-PcrV (Ac α-PcrV), anti-PopB (Ac α-PopB) ou anti-PopD (Ac α-PopD) et d'anticorps polyclonaux de souris purifiés anti-LcrV (Ac α-LcrV) ou d'anticorps monoclonaux de souris Mab166. Le test hémolytique est ensuite réalisé avec ce mélange de bactéries et d'anticorps, à une MOI de 1.

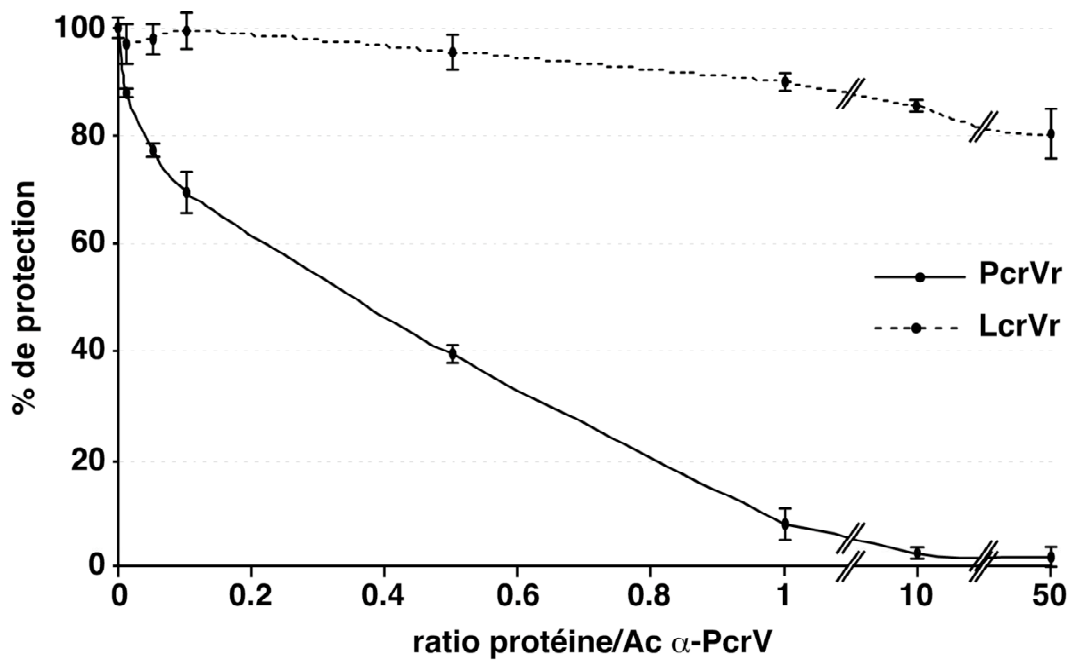
Enfin, on peut voir que les Ac polyclonaux purifiés, dirigés spécifiquement contre les protéines translocatrices PopB ou PopD, n'affectent pas l'activité hémolytique de *P. aeruginosa*, même à des concentrations de 50 ng/μl (Figure V.2). Ainsi, la protection conférée

par les anticorps capables de reconnaître PcrV est liée à la spécificité de ces anticorps et non à la quantité d'anticorps utilisé.

J'ai également testé le pouvoir protecteur d'anticorps polyclonaux purifiés spécifiques de PscF qui est le composant majeur de l'aiguille de l'injectisome chez *P. aeruginosa*. Cette aiguille est très probablement accessible aux anticorps puisqu'elle est localisée à la surface des bactéries. Cependant, les Ac anti-PscF, utilisés à des concentrations de 25, 50 et 100 ng/ $\mu$ l, ne protègent pas les GRM de l'hémolyse, qu'ils soient pré-incubés avec les bactéries ou avec les hématies (données non montrées).

Les protéines PcrV et LcrV sont des antigènes exposés à la surface de la bactérie (Pettersson et al., 1999; Ina Attrée, communication personnelle) et sont donc probablement accessibles aux anticorps. Afin de confirmer que la protection contre l'hémolyse conférée par les Ac anti-PcrV est due à une interaction directe entre ces anticorps et l'antigène au cours de l'infection, j'ai réalisé des expériences de compétition de la protection avec les protéines recombinantes PcrV (PcrVr) et LcrV (LcrVr). Pour ces expériences,  $5 \cdot 10^7$  bactéries ont été incubées avec les Ac polyclonaux purifiés anti-PcrV à une concentration finale de 5 ng/ $\mu$ l et des quantités croissantes de protéines PcrVr ou LcrVr afin de faire varier le rapport molaire protéine/anticorps entre 0,05 et 50 (figure V.3).

On observe sur la figure V.3 que l'ajout d'antigènes recombinants PcrV, à un rapport molaire d'environ 3-4 molécules de PcrV pour 10 molécules d'anticorps anti-PcrV, induit une inhibition de 50% de la protection conférée par 5 ng/ $\mu$ l de cet anticorps ( $8 \cdot 10^4$  molécules d'anticorps). Au-delà d'un rapport molaire PcrVr/Ac  $\alpha$ -PcrV de 1, la quasi-totalité de la capacité protectrice des Ac polyclonaux anti-PcrV est neutralisée (figure V.3). Par contre, l'antigène recombinant LcrV est incapable de titrer la protection conférée aux GRM par les Ac anti-PcrV, même à un rapport molaire LcrVr/Ac  $\alpha$ -PcrV de 50. Ces résultats confirment que l'inhibition de l'activité hémolytique, par les anticorps anti-PcrV est propre à la spécificité de ces anticorps, lesquels très probablement neutralisent la fonction biologique de PcrV dans l'assemblage du pore de translocation.



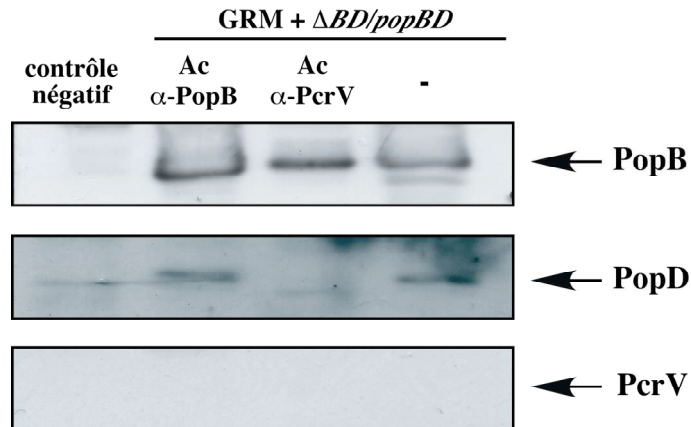
**Figure V.3. Titration des anticorps protecteurs anti-PcrV par les protéines recombinantes PcrV et LcrV.**

La souche CHA de *P. aeruginosa* est pré-incubée avec des anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV à une concentration finale de 5 ng/ $\mu$ l et des quantités croissantes de protéines recombinantes PcrV (PcrVr) ou LcrV (LcrVr) afin de faire varier le rapport molaire protéine/anticorps entre 0,05 et 50. Le test hémolytique est ensuite réalisé à une MOI de 1. Le pourcentage de protection est calculé en utilisant comme 100% de protection, le pourcentage d'hémolyse mesuré avec 5 ng d'Ac  $\alpha$ -PcrV / $\mu$ l.

### 3- Anticorps protecteurs anti-PcrV inhibent l'assemblage du pore de translocation

Comme précédemment démontrée, la protéine PcrV est requise pour l'assemblage de pores de translocation PopB/D fonctionnels dans les membranes des hématies. J'ai donc étudié l'effet de la neutralisation de PcrV, par les anticorps protecteurs, sur l'assemblage de ces pores de translocation. Pour cela, des tests hémolytiques à grande échelle ont été réalisés (*cf.* Matériels et Méthodes 5.B.4) en présence d'Ac polyclonaux purifiés anti-PcrV à une concentration finale de 15 ng/ $\mu$ l, afin d'obtenir entre 90 et 100% de protection des GRM.

Après une heure d'infection à 37°C, l'ensemble des hématies sont lysées par choc osmotique, et les membranes de GRM sont isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu. Les protéines translocatrices PopB et PopD sont ensuite recherchées dans la fraction membranaire par Western blot (figure V.4).



**Figure V.4. Assemblage des pores de translocation PopB/D en présence des anticorps protecteurs anti-PcrV.**

Infection à une MOI de 1 pendant 1 h à 37°C, de GRM ( $3.10^9$ ) par la souche CHA de *P. aeruginosa* en présence d'anticorps polyclonaux anti-PcrV ou anti-PopB, à une concentration finale de 15 ng/ $\mu$ l. Un contrôle négatif est réalisé en incubant les GRM avec les anticorps anti-PcrV à une concentration finale de 15 ng/ $\mu$ l. Les membranes de GRM ont été isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu, puis concentrées par ultracentrifugation. Les protéines présentes dans le culot membranaire ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées en Western blot à l'aide des anticorps polyclonaux purifiés anti-PcrV (1/3000<sup>ème</sup>) et anti-PopB (1/5000<sup>ème</sup>) et du sérum polyclonal anti-PopD (1/1000<sup>ème</sup>).

Comme il a été constaté dans le chapitre précédent, les deux protéines translocatrices, PopB et PopD, sont retrouvées dans les membranes d'hématies infectées par la souche parentale CHA de *P. aeruginosa* (figure V.4). Il est important de noter qu'en présence d'anticorps protecteur anti-PcrV, la protéine PopD est absente de la fraction membranaire de GRM infectés par CHA. Ce résultat corrobore avec le phénotype du mutant CHA $\Delta pcrV$ , lequel est incapable d'assembler des pores de translocation PopB/D fonctionnels dans les membranes des hématies (Goure *et al.*, 2004). De plus, ces anticorps protecteurs affectent

également l'insertion de la protéine PopB dans les membranes. En effet, en présence de ces anticorps, de plus faibles quantités de protéines PopB sont systématiquement détectées dans les membranes de GRM infectés par CHA, (figure V.4). Ceci n'est pas observé dans le mutant déficient pour la protéine PcrV (Goure *et al.*, 2004), ce qui pourrait être expliqué par un encombrement stérique, lié à l'interaction de ces anticorps avec l'antigène V qui perturbe l'insertion de PopB dans les membranes et/ou déstabilise les protéines PopB insérées dans les membranes des hématies. On peut également voir sur cette figure V.4 que les anticorps anti-PopB n'affectent pas l'insertion de PopB et PopD dans les membranes des cellules eucaryotes, ce qui concorde avec l'incapacité de ces anticorps à protéger les GRM de la lyse. Enfin, le fait qu'une quantité significative de protéines PopB soit insérée dans les membranes de GRM suggère que ces anticorps protecteurs n'empêchent pas le contact entre la cellule eucaryote hôte et l'injectisome du SSTT de *P. aeruginosa*.

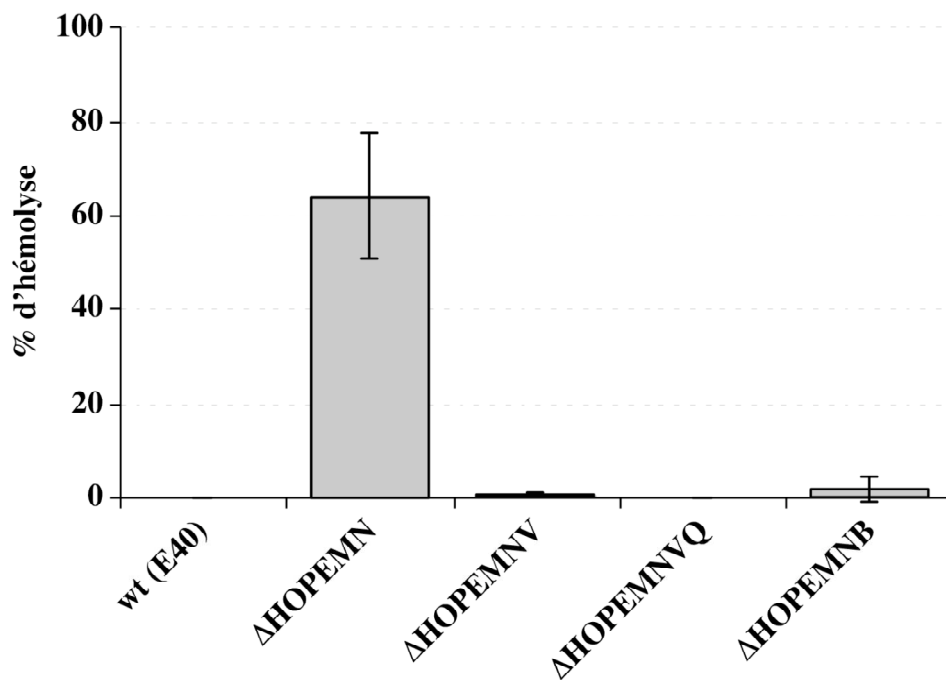
Les anticorps protecteurs anti-PcrV inhibent donc l'activité formatrice de pore dépendante du SSTT de *P. aeruginosa* en neutralisant l'activité biologique « $\square$ » l'assemblage du pore de translocation PopB/D $\square$  de PcrV.

#### 4- LcrV, protéine d'assemblage du pore de translocation YopB/D

J'ai pu observer que des anticorps polyclonaux purifiés, dirigés spécifiquement contre la protéine recombinante LcrV de *Y. pestis*, protègent les hématies de la lyse induite par le SSTT de *P. aeruginosa*. Ainsi, en collaboration avec Petr Broz, doctorant dans le laboratoire du Pr. G. Cornelis, nous avons étudié la composition et l'assemblage du pore de translocation du SSTT de *Y. enterocolitica* puis testé le pouvoir protecteur des anticorps anti-LcrV contre les infections à *Yersinia* spp.

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité hémolytique de plusieurs souches de *Y. enterocolitica* dans notre test d'hémolyse (figure V.5). Les conditions choisies pour le test d'hémolyse avec *Y. enterocolitica* sont identiques à celles utilisées avec *P. aeruginosa*. Comme l'ont rapporté les travaux de plusieurs auteurs (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a), on observe que la souche sauvage E40 de *Y. enterocolitica* est non hémolytique alors que la souche poly-mutante  $\Delta$ HOPMN, déficiente pour les effecteurs YopH, YopO, YopP, YopE et YopM ainsi que pour la protéine régulant la sécrétion YopN (Forsberg *et al.*, 1991), induit la lyse d'environ 60% des hématies (figure V.5). Contrairement

à la souche sauvage, ce mutant  $\Delta$ HOPEMN provoque également la lyse de macrophages, via la formation de pores probablement composés par les protéines translocatrices YopB et YopD (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a). Il a été montré que la délétion de *lcrV* affecte la sécrétion des protéines YopB et YopD (Lee *et al.*, 2000; Marenne *et al.*, 2003). Néanmoins, la délétion de *yopQ* supprime l'effet de la délétion de *lcrV* sur la sécrétion des protéines translocatrices. En effet, il a été montré que la souche  $\Delta$ HOPEMNVQ produit et sécrète des quantités similaires de YopB et YopD à la souche sauvage (Marenne *et al.*, 2003). Toutefois, la souche  $\Delta$ HOPEMNVQ, comme les souches mutantes  $\Delta$ HOPEMNB et  $\Delta$ HOPEMND, n'est pas hémolytique (Figure V.5) (Marenne *et al.*, 2003). L'activité hémolytique de la souche  $\Delta$ HOPEMN requiert donc l'expression des trois protéines LcrV, YopB et YopD (figure V.5) (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a).



**Figure V.5. Activité hémolytique SSTT-dépendante de *Y. enterocolitica*.**

Les GRM sont infectés par la souche sauvage de *Y. enterocolitica* (wt E40) et par les quatre autres souches mutantes  $\Delta$ HOPEMN,  $\Delta$ HOPEMNB,  $\Delta$ HOPEMNV et  $\Delta$ HOPEMNVQ, à une MOI de 1.

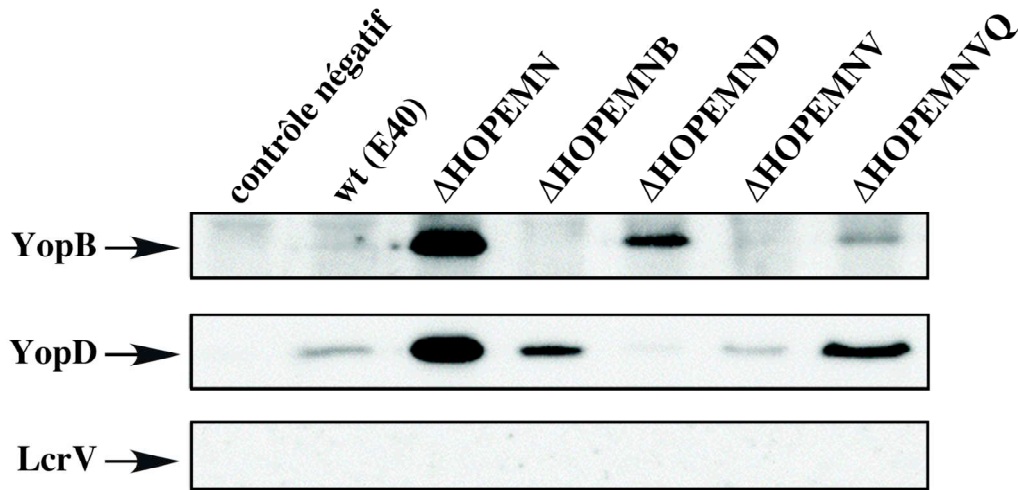


L'activité hémolytique dépendante du SSTT de *Y. enterocolitica* est donc suffisamment significative pour utiliser les GRM comme modèle cellulaire afin d'étudier la présence des protéines LcrV, YopB et YopD dans les membranes de cellules eucaryotes infectées par *Y. enterocolitica* ainsi que la fonction de LcrV dans la formation du pore de translocation YopB/D.

Ainsi, les protéines LcrV, YopB et YopD ont été recherchées par Western blot dans les membranes isolées d'hématies infectées par la souche sauvage E40 de *Y. enterocolitica* ou par les mutants  $\Delta$ HOPEMN,  $\Delta$ HOPEMNB,  $\Delta$ HOPEMND,  $\Delta$ HOPEMNV et  $\Delta$ HOPEMNVQ (figure V.6). Ces expériences ont été principalement réalisées par Petr Broz à Grenoble et à Bâle. Sur la figure V.6, on peut voir que seules les protéines translocatrices, YopB et YopD, sont retrouvées en quantité significative dans les membranes de GRM infectés par le mutant hémolytique  $\Delta$ HOPEMN. Ces deux protéines constituent donc le coeur membranaire, du pore de translocation inséré dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes,

L'analyse des membranes de GRM infectés par le mutant  $\Delta$ HOPEMNB ou  $\Delta$ HOPEMND montre que l'absence de YopB n'affecte pas l'insertion de YopD dans les membranes d'hématies, et inversement l'insertion de YopB ne requiert pas la protéine YopD (figure V.6).

L'antigène V de *Y. enterocolitica* (LcrV), qui est essentielle à l'activité formatrice de pore, n'est jamais retrouvé associé aux membranes de GRM (figure V.6). Cependant, en absence de cet antigène, mutant  $\Delta$ HOPEMNVQ, très peu de protéines YopB sont détectées dans les membranes de GRM alors que la quantité de YopD est similaire à celle retrouvée dans les membranes d'hématies infectées par la souche  $\Delta$ HOPEMN. La protéine LcrV est donc nécessaire à l'insertion et/ou à la stabilisation de YopB dans les membranes des GRM. Ces résultats indiquent que l'antigène V de *Y. enterocolitica*, comme celui de *P. aeruginosa*, intervient dans l'assemblage des pores de translocation YopB/D fonctionnels dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes.



**Figure V.6. Insertion des protéines YopB et YopD dans les membranes d'hématies infectées par *Y. enterocolitica*.**

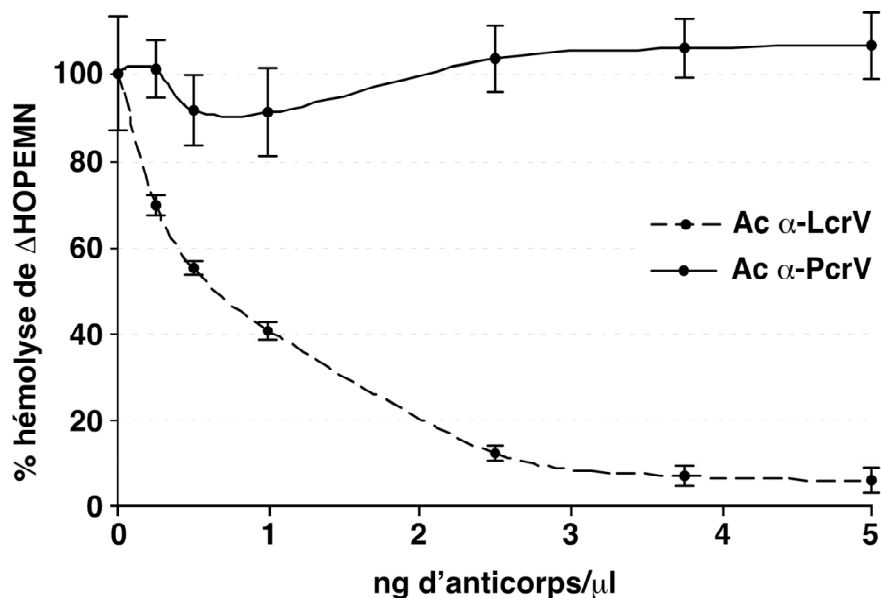
Les GRM ont été infectés par les différentes souches de *Y. enterocolitica* indiquées sur la figure, à une MOI de 1 pendant 1 h à 37°C. Les membranes infectées de GRM ont été isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu, puis concentrées par ultracentrifugation. Les protéines présentes dans le culot membranaire ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées en Western blot à l'aide des anticorps polyclonaux purifiés de souris anti-LcrV (1/1000<sup>ème</sup>), du sérum polyclonal anti-YopB (1/1000<sup>ème</sup>) et des anticorps monoclonaux de rat anti-YopD (1/1000<sup>ème</sup>).

Contrairement aux membranes infectés par le mutant  $\Delta$ HOPEMN, de très faibles quantités de protéines YopB et YopD sont détectées dans la fraction membranaire de GRM infectés par la souche sauvage. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la souche sauvage nécessite une activation de la sécrétion du SSTT alors que toutes les autres souches mutantes utilisées sont déficientes pour YopN et sécrètent donc constitutivement les protéines du SSTT (Forsberg *et al.*, 1991). De plus, il est probable que l'utilisation des hématies comme modèle cellulaire ne permet pas une activation importante de la sécrétion de type III. Ainsi, de faibles quantités de protéines translocatrices sont sécrétées et insérées dans les membranes des hématies. Afin de valider cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser des expériences similaires avec une souche de *Y. enterocolitica* déficiente uniquement pour la protéine YopN.

## 5- Inhibition de l'assemblage du pore de translocation YopB/D de *Y. enterocolitica* par les anticorps anti-LcrV

La suite de mon travail a consisté à réaliser des expériences d'immunoprotection en microplaque 96 puits afin de tester le pouvoir protecteur, contre les infections à *Yersinia* spp., d'Ac polyclonaux dirigés spécifiquement contre la protéine recombinante LcrV de *Y. pestis* (figure V.7).

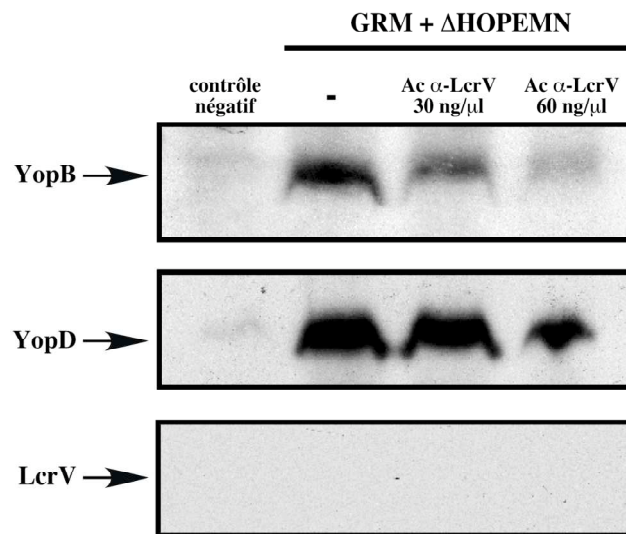
On observe sur la figure V.7, que ces Ac anti-LcrV protègent également, de façon dose dépendante, les GRM de la lyse induite par le SSTT de *Y. enterocolitica*. À une concentration finale de 0,7 ng/ $\mu$ l, soit environ  $1,1 \cdot 10^4$  anticorps par bactérie, ces Ac anti-LcrV induisent une diminution de 50% de l'hémolyse, et au-delà de 4 ng d'anticorps/ $\mu$ l, la quasi-totalité des GRM est protégée de l'activité formatrice de pores de *Y. enterocolitica* (figure V.7). On peut voir que les Ac polyclonaux anti-PcrV ne protègent pas les GRM de l'infection à *Y. enterocolitica*. Ce résultat concorde avec l'incapacité de la protéine recombinante LcrV à titrer la protection conférée par ces Ac anti-PcrV contre les infections à *P. aeruginosa*.



**Figure V.7.** Effet dose dépendant des anticorps protecteurs anti-LcrV sur la protection conférée par les anticorps protecteurs.

La souche mutante  $\Delta$ HOPEMN de *Y. enterocolitica* est pré-incubée pendant 45 minutes avec des quantités variables d'anticorps polyclonaux de lapin purifiés anti-PcrV (Ac  $\alpha$ -PcrV) ou d'anticorps polyclonaux de souris purifiés anti-LcrV (Ac  $\alpha$ -LcrV).

Ensuite, Petr Broz a étudié, à Bâle, l'assemblage du pore de translocation YopB/D dans les membranes d'hématies en présence des anticorps protecteurs anti-LcrV (figure V.8). La démarche expérimentale est similaire à celle entreprise pour étudier l'effet des anticorps protecteurs anti-PcrV sur l'assemblage du pore de translocation de *P. aeruginosa* (paragraphe C de ce chapitre). La souche  $\Delta$ HOPEMN de *Y. enterocolitica* a été pré-incubée pendant 30 minutes avec des quantités d'anticorps protecteurs anti-LcrV nécessaires pour obtenir 100% de protection des GRM.



**Figure V.8. Effet des anticorps anti-LcrV sur l'assemblage du pore de translocation YopB/D du SSTT de *Y. enterocolitica*.**

La souche  $\Delta$ HOPEMN de *Y. enterocolitica* préalablement pré-incubée avec les anticorps polyclonaux purifiés de souris anti-LcrV afin d'obtenir une concentration finale d'anticorps de 30 ou 60 ng/ $\mu$ l. L'infection des GRM ( $3 \cdot 10^9$ ) est ensuite réalisée à une MOI de 1, pendant 1 h à 37°C. Les membranes de GRM sont isolées par flottaison sur un gradient de saccharose discontinu, puis concentrées par ultracentrifugation. Les protéines présentes dans le culot membranaire sont séparées par SDS-PAGE puis analysées en Western blot à l'aide des anticorps polyclonaux purifiés de souris anti-LcrV (1/1000<sup>ème</sup>), du sérum polyclonal anti-YopB (1/1000<sup>ème</sup>) et des anticorps monoclonaux de rat anti-YopD (1/1000<sup>ème</sup>). Le contrôle négatif correspond aux membranes isolées de GRM non-infectés.

En présence des Ac protecteurs anti-LcrV, on observe une diminution très importante des quantités de protéines YopB et YopD détectées dans la fraction membranaire de GRM, infectés par la souche  $\Delta$ HOPEMN (figure V.8). Cependant, l'insertion de YopB dans les

membranes de GRM est plus sévèrement affectée par la neutralisation de l'antigène V, par ces Ac protecteurs, que l'insertion de YopD. Ce résultat concorde avec le phénotype de la souche mutante  $\Delta$ HOPEMNVQ et confirme un rôle essentiel de LcrV dans la stabilisation et/ou l'insertion de YopB dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. La diminution de la quantité de YopD, retrouvée dans les membranes de GRM infectés par la souche  $\Delta$ HOPEMN en présence des anticorps protecteurs, est très probablement un effet indirect de ces anticorps, lié à un encombrement stérique de ces derniers. Ces résultats démontrent le rôle essentiel de LcrV dans l'assemblage de pores de translocation YopB/D fonctionnels.

Les travaux présentés dans ce chapitre font l'objet de l'Article 3 qui est en révision: Goure J., Broz P., Attree O., Cornelis G. et Attree I. (2005). Protective anti-V antibodies inhibits *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes (Annexe 3).

## 6- Discussion

L'analyse de la composition du pore de translocation du SSTT de *Y. enterocolitica*, réalisée en collaboration avec P. Broz, montre que, comme chez *P. aeruginosa*, les protéines translocatrices, YopB et YopD, constituent le pore de translocation du SSTT de *Y. enterocolitica*, inséré dans la membrane de la cellule eucaryote. Ce pore de translocation est très probablement un complexe hétéro-oligomérique YopB/D, puisque ces deux protéines translocatrices interagissent entre elles (Sarker *et al.*, 1998a). L'assemblage fonctionnel de ces complexes est réalisé par la protéine LcrV qui par ailleurs interagit, *in vitro*, avec les constituants de ces complexes (Sarker *et al.*, 1998a). L'antigène V pourrait également faciliter l'insertion de ces complexes YopB/D dans les membranes ou les stabiliser une fois insérés dans les membranes hôtes.

La composition et le mécanisme d'assemblage des pores de translocation du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. sont donc très similaires. L'antigène V, qui est une protéine clé dans le processus de translocation de ces deux SSTT, agirait comme une chaperone extracellulaire responsable de l'assemblage des protéines translocatrices en complexe hétéro-oligomérique fonctionnel. Ces complexes, insérés dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes cibles, constituent des pores qui permettent la translocation des effecteurs du SSTT. Ces résultats remettent fortement en cause l'activité formatrice de pore de

l'antigène V, aussi bien de *P. aeruginosa* que de *Yersinia* spp., décrite par Holmström *et al.* (2001). De plus, ces antigènes V n'ont jamais été retrouvés associés aux membranes hôtes.

Nous avons montré qu'aussi bien dans le SSTT de *P. aeruginosa* que de *Yersinia* spp., chacune des deux protéines translocatrices est capable de s'insérer dans la membrane des hématies en l'absence de l'autre. Par contre, l'insertion et/ou la stabilisation de YopB dans les membranes eucaryotes nécessite l'antigène V alors que chez *P. aeruginosa*, c'est le translocateur PopD qui requiert l'antigène V pour s'insérer dans les membranes eucaryote. En supposant que les protéines translocatrices s'insèrent uniquement sous forme d'oligomères, on peut imaginer que la formation d'oligomères de YopB et d'hétéro-oligomères YopB/D nécessitent des interactions spécifiques entre LcrV et YopB, de même que la formation d'oligomères de PopD et d'hétéro-oligomères PopB/D nécessitent des interactions spécifiques entre PcrV et PopD. Cette hypothèse est renforcée par l'absence de translocation des effecteurs Yops dans le cytosol de cellules HeLa infectées par un mutant  $\Delta yopD$  complémenté par les gènes *popD* ou *pcrHpopD* (Bröms *et al.*, 2003a) mais également par l'incapacité de PcrV à restaurer de façon significative l'activité formatrice de pore SSTT dépendante d'un mutant  $\Delta lcrV$  (Bröms *et al.*, 2003c; Holmström *et al.*, 2001). Les trois protéines homologues qui composent le pore de translocation chez *P. aeruginosa* et *Yersinia* spp. ne sont donc pas interchangeable.

Par ailleurs, la présence des protéines YopB et YopD, même en faible quantité, dans les membranes de GRM infectés par la souche sauvage E40, qui est non-hémolytique et non-cytotoxique envers les macrophages (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a) suggère que des pores de translocation fonctionnels sont insérés dans les membranes des cellules eucaryotes. Ceci confirme que l'absence de cytotoxicité de la souche sauvage envers les hématies et les macrophages est due à une obstruction des pores de translocation par le trafic des effecteurs Yops (Marenne *et al.*, 2003; Neyt et Cornelis, 1999a).

Nous avons également montré dans ce chapitre que parmi les protéines PcrV, PopB et PopD, essentielles à l'activité hémolytique SSTT-dépendante de *P. aeruginosa*, seule PcrV possède un pouvoir antigénique induisant la synthèse d'anticorps capables de protéger les globules rouges.






La présence d'anticorps spécifiques des protéines PopB et PopD dans le sérum de nombreux patients CF infectés par *P. aeruginosa* suggère d'une part que le SSTT est exprimé

durant les infections chroniques des poumons CF et d'autre part, que ces protéines antigéniques sont reconnues par le système immunitaire (Moss *et al.*, 2001). Il était donc concevable de penser que ces protéines translocatrices pouvaient représenter des cibles thérapeutiques. Cependant, des anticorps polyclonaux spécifiques de ces protéines n'inhibent ni l'activité l'hémolytique, ni la translocation des effecteurs du SSTT dans le cytosol des macrophages (Sawa *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent d'une part que les complexes hétéro-oligomériques PopB/D, probablement assemblés au sommet de l'aiguille de l'injectisome, ne sont pas accessibles aux anticorps. De plus, il est possible que les anticorps polyclonaux utilisés, anti-PopB et anti-PopD, ne reconnaissent pas les protéines PopB et PopD sous cette conformation hétéro-oligomérique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre les formes oligomériques des protéines PopB et PopD mais il serait également intéressant de produire des anticorps spécifiques des hétéro-oligomères PopB/D.

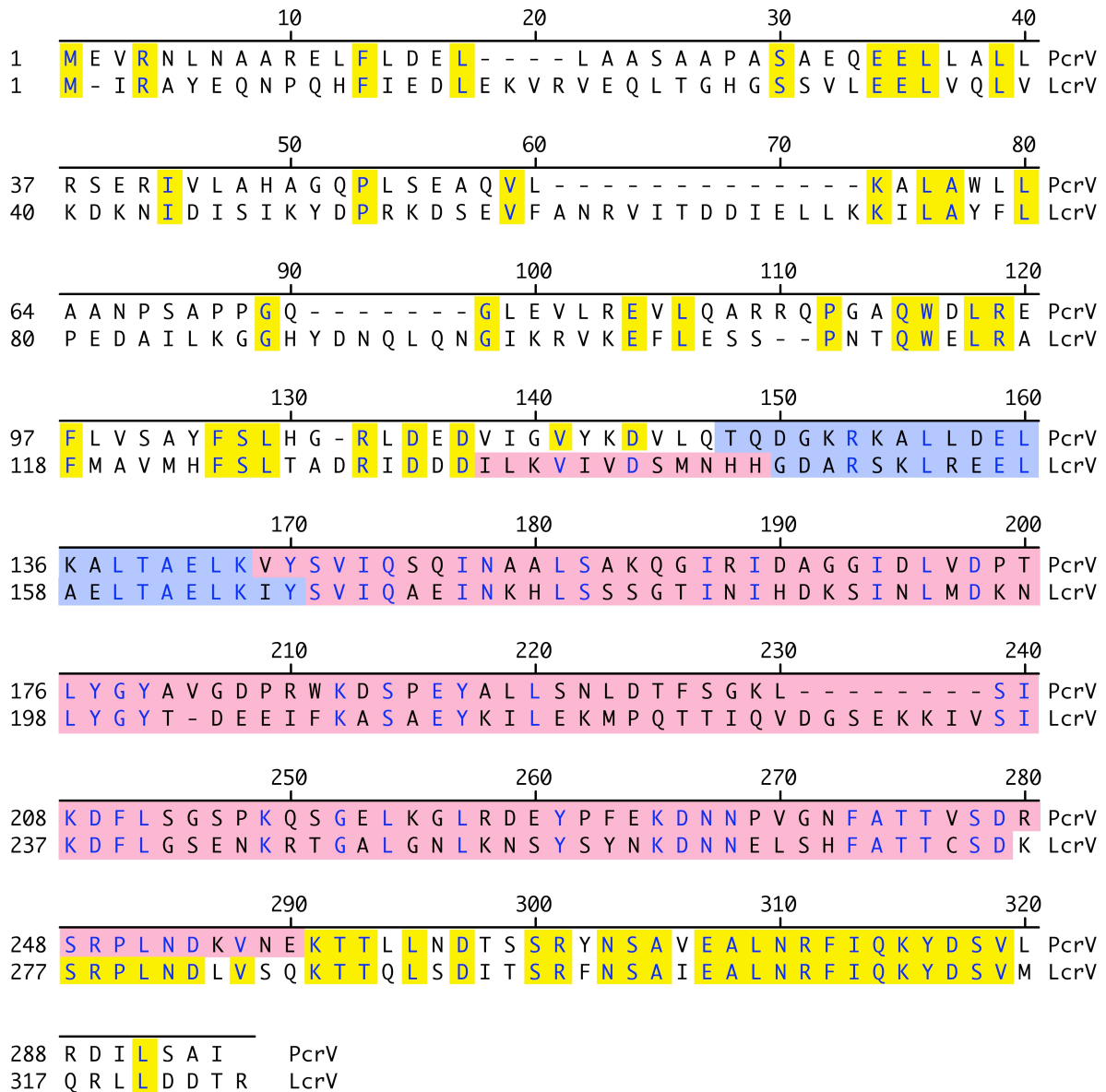
L'efficacité de la protection conférée par les anticorps spécifiques de PcrV varie selon la nature de ces anticorps. Les Ac polyclonaux purifiés anti-PcrV protègent plus efficacement les GRM de la lyse induite par *P. aeruginosa* et confèrent une meilleure protection aux souris contre des infections létales à *P. aeruginosa* (Frank *et al.*, 2002) que les Ac monoclonaux Mab166. Le sérum polyclonal purifié anti-PcrV possède donc une capacité plus importante de neutralisation de l'antigène V que les Ac monoclonaux Mab166. Ceci peut s'expliquer d'une part, par une plus grande affinité des ac protecteurs polyclonaux pour la région protectrice de PcrV, comprise entre les résidus 144 et 257, que celle des Ac Mab166 (Frank *et al.*, 2002). D'autre part, il est possible que la fixation d'anticorps sur plusieurs épitopes de PcrV soit plus efficace que la fixation d'un anticorps sur un seul épitope de PcrV. De plus, la région protectrice de PcrV est assez large, il est donc probable que le sérum polyclonal anti-PcrV contiennent des anticorps spécifiques de différentes parties de cette région. Ainsi, l'utilisation d'un mélange d'anticorps monoclonaux spécifiques de différents épitopes pourrait permettre une neutralisation plus efficace de PcrV, comme cela a été montré pour la toxine botulique de type A (Nowakowski *et al.*, 2002). L'immunothérapie, basée sur des anticorps recombinants murins humanisés anti-PcrV, pourrait donc être une option thérapeutique potentielle dans le cas de patients immunodéprimés infectés par *P. aeruginosa*.

La protection conférée par ces anticorps protecteurs anti-PcrV est due à une interaction directe entre ces anticorps et l'antigène V et il en est probablement de même pour


les anticorps anti-LcrV qui inhibent l'activité hémolytique induite par le SSTT de *Y. enterocolitica*. Ces anticorps anti-PcrV et anti-LcrV agissent de façon similaire. L'interaction de l'anticorps protecteur avec l'antigène V neutralise la fonction biologique de l'antigène V, ce qui se traduit par une inhibition de l'assemblage du pore de translocation. L'absence de translocation des effecteurs du SSTT de *P. aeruginosa* dans les macrophages, en présence de sérum polyclonal purifié anti-PcrV, confirme ce mécanisme d'action des anticorps protecteurs (Sawa *et al.*, 1999). La neutralisation de l'antigène V induit les mêmes conséquences sur l'assemblage du pore de translocation que l'absence totale de cet antigène. Ceci confirme la fonction essentielle de l'antigène V, dans l'assemblage du pore de translocation du SSTT, qui pourrait agir comme une chaperone extracellulaire des protéines translocatrices.

J'ai précédemment suggéré que l'assemblage d'hétéro-oligomères PopB/D comme YopB/D nécessite des interactions spécifiques avec leur antigène V respectif. Il est donc très probable que ces interactions se font via le domaine d'interaction protéine-protéine de type «coiled-coil» de ces antigènes V. Les domaines «coiled-coil » possèdent une architecture structurale simple, généralement composée de deux à cinq hélices- $\alpha$  amphiphiles qui s'enroulent les unes sur les autres afin de former une structure super-enroulée appelée «supercoil» (Burkhard *et al.*, 2001; Cohen et Parry, 1990). La stabilité de cette structure peut être modulée par de nombreux facteurs comme, des interactions ioniques (Burkhard *et al.*, 2000; Krylov *et al.*, 1998), le pH (Bullough *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997), la phosphorylation de résidus (Liang *et al.*, 1999; Szilak *et al.*, 1997) et l'interaction d'ions (Farah et Reinach, 1999). Or, le domaine «coiled-coil» de PcrV est très proche de la région antigénique protectrice de cette protéine (résidus 144 et 257) (Frank *et al.*, 2002), et celui de LcrV est inclus dans son épitope protecteur (résidus 135 et 275) (Pettersson *et al.*, 1999) (figure V.9). Il est donc probable que l'interaction entre les anticorps protecteurs et la région antigénique protectrice provoque une déstabilisation de la structure du domaine «coiled-coil» et/ou un encombrement stérique, ce qui peut inhiber toute interaction entre l'antigène V et les protéines translocatrices.




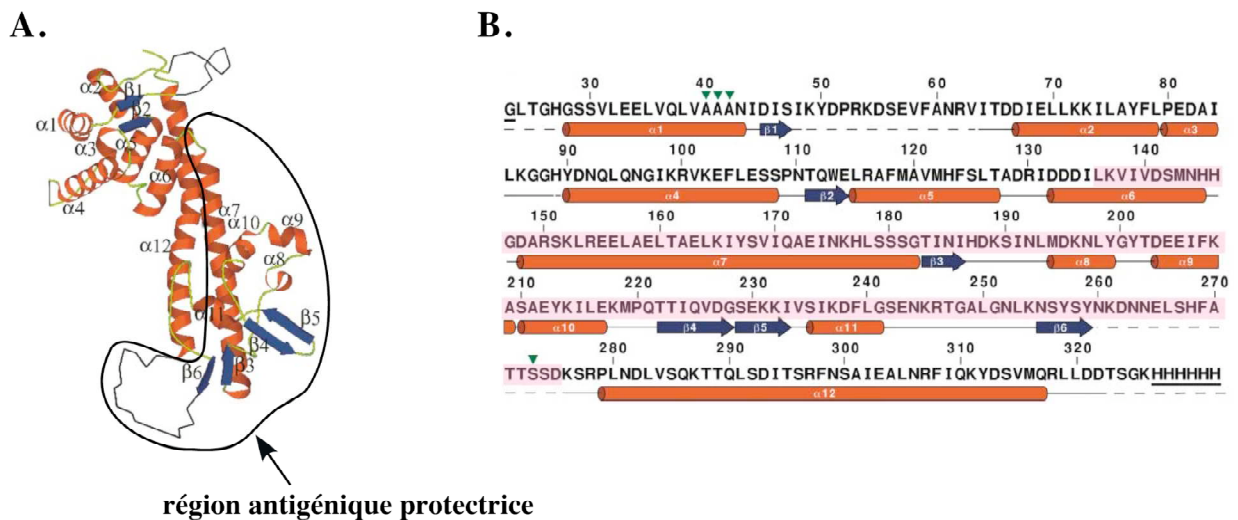


**Figure V.9. Alignement des séquences protéiques de PcrV de *P. aeruginosa* et de LcrV de *Y. pestis*.**

L’alignement est réalisé avec programme Clustal W. Les résidus identiques sont en bleu (sur fond jaune ou non). Les épitopes protecteurs sont indiqués par un fond rose et les motifs «coiled-coil» prédits avec le programme COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) sont représentés par un fond bleu.

Le sérum polyclonal purifié anti-LcrV de *Y. pestis* protège les hématies de la lyse induite par le SSTT de *Y. enterocolitica* ce qui confirme la réactivité croisée déjà observée entre les antigènes V de ces deux espèces de *Yersinia* pathogènes (Alonso *et al.*, 1980; Motin *et al.*, 1994; Wake *et al.*, 1978; Wake et Sutoh, 1983).

De plus, ces Ac polyclonaux anti-LcrV inhibent l'activité SSTT-dépendante de *P. aeruginosa*. Cette réaction immunitaire croisée, entre les anticorps anti-LcrV et la protéine PcrV, indique que les anticorps protecteurs anti-LcrV sont capables d'interagir avec l'épitope protecteur de PcrV. Cependant, les anticorps spécifiques de l'épitope protecteur de PcrV sont incapables d'interagir avec la région antigénique protectrice de LcrV. En effet, d'une part, les anticorps polyclonaux anti-PcrV n'inhibent pas l'activité hémolytique de la souche  $\Delta$ HOPEMN de *Y. enterocolitica* et d'autre part la protéine recombinante LcrV est incapable de titrer la protection conférée aux GRM par les anticorps protecteurs anti-PcrV. Ces résultats suggèrent que ces épitopes protecteurs présentent des similarités au niveau de leur conformation tridimensionnelle. Cependant, il est probable que l'épitope protecteur de LcrV soit plus large et/ou contienne des motifs structuraux supplémentaires par rapport à l'épitope protecteur de PcrV. En effet, la région antigénique protectrice de LcrV, localisée dans la région centrale de la protéine (résidus 135 et 275) (Pettersson *et al.*, 1999), inclut l'hélice  $\alpha$ -6, l'hélice  $\alpha$ -7 qui est impliquée dans le domaine «coiled-coil» intramoléculaire et le domaine globulaire C-terminal de la protéine (figure V.10). L'épitope protecteur de PcrV, compris entre les résidus 144 et 257 (Frank *et al.*, 2002), ne contient probablement pas les hélices  $\alpha$  qui correspondent aux hélices  $\alpha$ -6 et  $\alpha$ -7.



**Figure V.10.** Structure primaire, secondaire et tertiaire de l'épitope protecteur de LcrV de *Y. pestis* (d'après Derewenda *et al.*, 2004).

**A.** Structure tertiaire de LcrV, les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont respectivement colorés en rouge et en bleu.

**B.** Séquence protéique de LcrV. La localisation des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$  est indiquée sous la séquence, respectivement en rouge et en bleu. La région antigénique protectrice est représentée par un fond rose.



**CHAPITRE VI**

**CONCLUSION GÉNÉRALE**  
**ET**  
**PERSPECTIVES**



Afin d'éviter toute confusion au cours de cette conclusion, je souhaite tout d'abord redéfinir quelques termes fréquemment utilisés dans la description des différents processus de transport de protéines. Je parle de «mécanisme de translocation» pour décrire le passage de protéines à travers une membrane, plutôt que «l'exportation» et de «sécrétion», termes qui définissent, respectivement, le passage à travers les membranes interne et externe des bactéries à Gram négatif. Le passage direct des protéines à travers les membranes est accompli par «un pore» (ou canal) que je définis comme le «translocon». Ce dernier peut être aussi bien inséré dans les membranes bactériennes interne et externe que dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote. Le terme «translocatrice» ou «translocateur» est utilisé pour définir une protéine membranaire qui compose un translocon. Enfin, une «translocase» est une protéine ou un complexe protéique qui assure le transport du substrat protéique à travers le translocon.

Les travaux développés au cours de cette thèse contribuent à une avancée des connaissances concernant la composition et l'assemblage des pores de translocation du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp.

## 1- Protéines essentielles à la formation du translocon

Dans un premier temps, nous avons démontré, par mutagenèse, que l'expression et la sécrétion des protéines, PcrV, PopB et PopD par la même bactérie, sont essentielles à la formation du translocon du SSTT de *P. aeruginosa* dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. Ces résultats sont en adéquation avec les nombreuses études réalisées sur le translocon du SSTT (Ysc) de *Yersinia* spp., lequel requiert la sécrétion par la même bactérie des protéines homologues, LcrV, YopB et YopD (Marenne *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la construction d'un mutant  $\Delta$ PcrV non-polaire, aussi bien dans les isolats cliniques CHA et PAK (Sundin *et al.*, 2002) que dans la souche de référence PAO1 de *P. aeruginosa*, n'a pas permis de confirmer le rôle de régulateur négatif de la sécrétion du SSTT attribué à PcrV par Sawa *et al.* (1999) dans la souche PA103. Cette incohérence, entre les phénotypes des différents mutants  $\Delta$ PcrV, pourrait être dépendante des souches utilisées et des conditions d'induction utilisées. La réalisation dans la souche PAO1 d'une mutation du gène *pcrV* identique à celle réalisée par Sawa *et al.* (1999), dans la souche PA103, pourrait permettre d'éclaircir la situation concernant cette fonction de PcrV.

## 2- Etude de la composition des translocons de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. dans les membranes des cellules hôtes

L'utilisation des hématies, comme modèle cellulaire, nous a permis d'étudier les protéines qui composent le translocon des SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. L'analyse par Western blot de membranes de GRM infectés par des souches de *P. aeruginosa* et de *Y. enterocolitica* a révélé que les couples de protéines PopB-PopD et YopB-YopD constituent respectivement les translocateurs des SSTT de ces deux pathogènes. La mise en évidence des interactions PopB-PopD (Goure *et al.*, 2004) et YopB-YopD (Sarker *et al.*, 1998a) indique que le pore de translocation, inséré dans les membranes hôtes, est un complexe hétéro-oligomérique des protéines translocatrices propres à chacun des SSTT. Ces complexes hétéro-oligomériques sont très probablement assemblés avant de s'associer et de s'insérer dans les membranes hôtes. En effet, l'insertion et/ou la stabilisation dans ces membranes des translocateurs PopD et YopB nécessitent la présence de leur antigène V respectif.

## 3- L'antigène V: organisateur structural du translocon

Les protéines PcrV et LcrV qui sont probablement localisées au sommet de l'aiguille de l'injectisome de leur SSTT respectif (Pettersson *et al.*, 1999; Attrée, communication personnelle) ne sont jamais retrouvées associées aux membranes hôtes. L'utilisation de souches mutantes de *P. aeruginosa* et de *Y. enterocolitica* pour l'antigène V, indique que cet antigène est essentiel à l'assemblage du translocon du SSTT. PcrV et LcrV agiraient donc comme des «chaperones extracellulaires» au sommet de l'aiguille, organisant ainsi l'assemblage des protéines translocatrices propres à leur SSTT, en complexe hétéro-oligomérique.

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous permettent de proposer un modèle du mécanisme d'assemblage du translocon du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. (figure VI.1). Le contact de la bactérie avec la cellule eucaryote va induire l'expression des protéines PopB et PopD qui, dans le cytosol bactérien, sont associées à leur chaperone PcrH. L'aiguille de l'injectisome se forme par polymérisation de la protéine PscF à la surface de la bactérie. L'antigène V sécrété à l'intérieur de cette aiguille, s'assemblerait en un complexe

oligomérique au sommet de celle-ci (figure VI.1A). Ensuite, les protéines translocatrices, PopB et PopD, sont sécrétées à travers l'injectisome au sommet duquel l'antigène V les organiserait en un complexe hétéro-oligomérique, de six à huit sous-unités, associé à la membrane eucaryote (figure VI.1B). Ce complexe hétéro-oligomérique PopB/D s'insère dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote, probablement au niveau de micro-domaines enrichis en cholestérol, ce qui génère le translocon (figure VI.1C). Le pore ainsi formé, de diamètre interne  $\approx 43$  Å et externe  $\approx 100$  Å, permet la translocation des effecteurs cytotoxiques dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible (figure VI.1C).

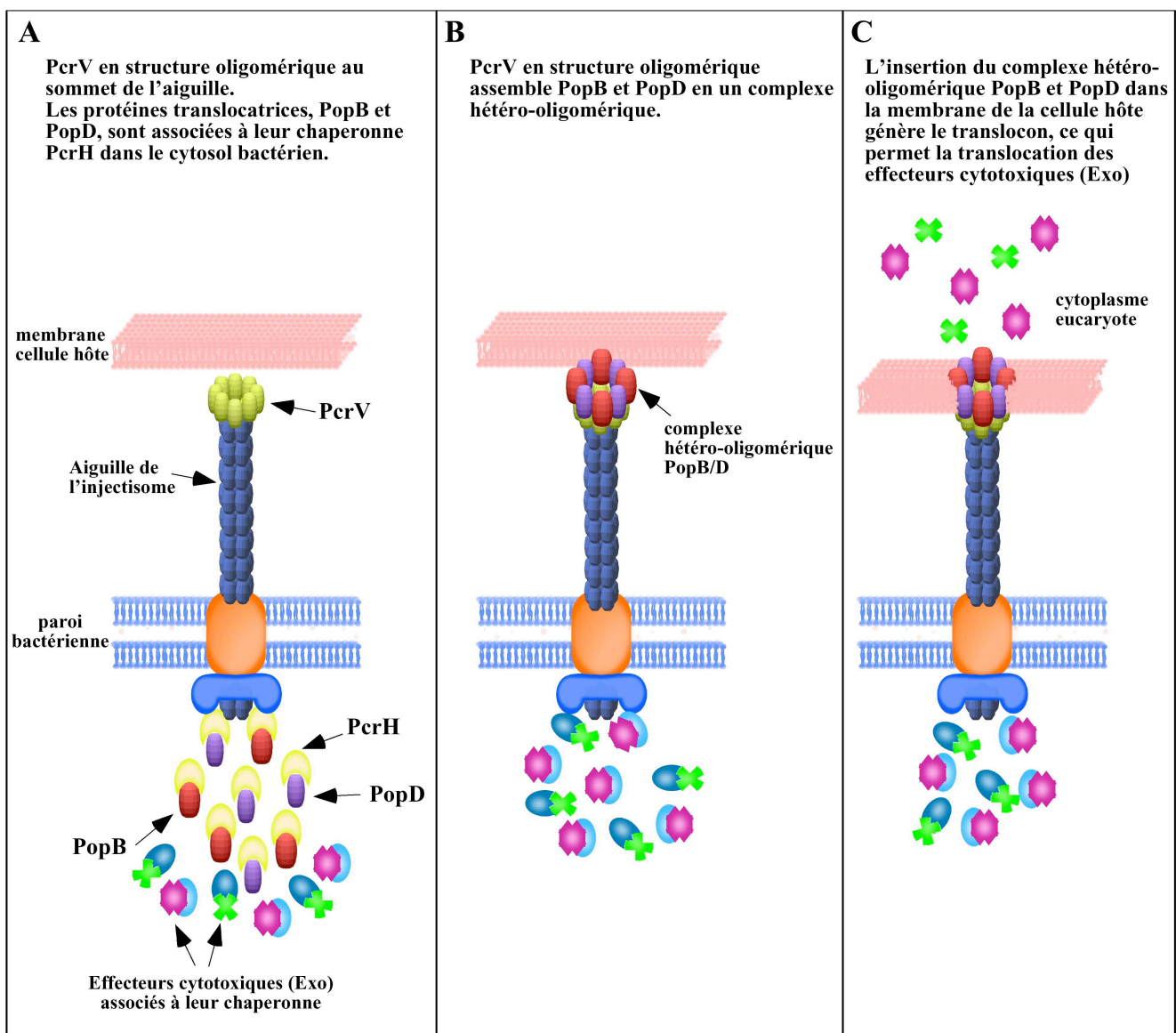


Figure VI.1. Modèle d'assemblage du pore de translocation PopB/D de *P. aeruginosa*



Toutefois, ce modèle nécessite la confirmation de nombreux points. D'une part, l'oligomérisation de l'antigène V au sommet de l'injectisome n'a encore jamais été démontré. Cependant, il semble probable que cette protéine agisse sous une forme oligomérique comme un « échafaudage » pour l'assemblage du complexe multimérique PopB/D, plutôt que sous forme monomérique. D'autre part, le rôle de cet antigène V en tant que « pont » entre l'aiguille et le translocon, nécessite de mettre en évidence des interactions entre l'antigène V et le composant de l'aiguille et entre ce même antigène et les protéines translocatrices. Concernant LcrV, des interactions avec les protéines YopB et YopD ont déjà été mises en évidence (Sarker *et al.*, 1998a), ce qui n'est pas le cas pour PcrV avec PopB et PopD (Allmond *et al.*, 2003; Goure *et al.*, 2004; Schoehn *et al.*, 2003). Par contre, aucune interaction n'a encore été mise en évidence que ce soit entre LcrV et YscF ou PcrV et PscF. La difficulté de telles expériences d'interaction réside dans le fait que l'antigène V interagit probablement avec la structure oligomérique qu'est l'aiguille, plutôt qu'avec la forme monomérique de PscF, que nous sommes capable de purifier au laboratoire.

Il a été suggéré que le cholestérol, présent en quantité importante dans les radeaux lipidiques, est essentiel à l'insertion dans les membranes eucaryotes de IpaB, l'homologue de PopB chez *S. flexneri* (Van Der Goot *et al.*, 2004). De plus, Schoehn *et al.*, 2003 ont montré que le cholestérol est essentiel à l'insertion des oligomères PopB et PopD dans les liposomes (Schoehn *et al.*, 2003). Il est donc possible que le cholestérol induise des changements de conformation du complexe hétéro-oligomérique des deux protéines translocatrices, changements qui permettent l'insertion de ce dernier dans les membranes des cellules eucaryotes. Afin de tester cette hypothèse, il sera intéressant d'étudier l'assemblage et l'insertion du translocon du SSTT, dans des membranes de GRM préalablement traités avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine qui extrait le cholestérol de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (Xavier *et al.*, 1998). La description des radeaux lipidiques comme étant des sites préférentiels pour les interactions « Bactéries-cellules » (Manes *et al.*, 2003; Van Der Goot et Harder, 2001), tient probablement plus au fait que ce sont des micro-domaines enrichis en cholestérol (Simons et Ikonen, 1997) qu'à la présence, dans ces derniers, de récepteurs des protéines bactériennes, notamment en ce qui concerne les infections à *P. aeruginosa* et *Yersinia* spp.

Enfin, la stochiométrie des complexes hétéro-oligomériques représentés dans ce modèle est hypothétique et repose sur les structures, en forme d'anneau, visualisées par MET dans les membranes de GRM infectés par la souche parentale de *P. aeruginosa*. Il serait

nécessaire de réaliser une étude structurale du translocon des SSTT de *P. aeruginosa* et *Yersinia* spp. afin de déterminer le nombre de sous-unités qui composent ces complexes. La visualisation de ces translocons, par microscopie électronique à balayage ou par microscopie à force atomique, associée à une numérisation des clichés, pourrait permettre de modéliser la structure de ces complexes hétéro-oligomériques. L'étude de la stochiométrie de ces complexes nécessite la réalisation d'expériences d'immuno-microscopie électronique.

#### **4- Un mécanisme d'assemblage du translocon du SSTT commun à toutes les espèces bactériennes □**

Le mécanisme d'assemblage du translocon du SSTT de *P. aeruginosa* et de *Yersinia* spp. sont très similaires, même si les protéines nécessaires à l'assemblage et à la composition de ces translocons ne sont pas interchangeables.

Au cours de ces 3 ou 4 dernières années, les études du translocon des SSTT d'EPEC, de *Shigella* spp. et de *Salmonella* spp. indiquent que ce translocon est systématiquement composé de deux protéines translocatrices qui interagissent ensemble (Blocker *et al.*, 1999 □ Hayward *et al.*, 2000 □ Osiecki *et al.*, 2001 □ Wachter *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1998 □ Ceci suggère que, quel que soit le SSTT, le translocon inséré dans la membrane hôte est un complexe hétéro-oligomérique des deux protéines translocatrices propres au SSTT.

Chez *Shigella* spp. et *Salmonella* spp. (SPI-1), outre les deux protéines translocatrices propres à leur SSTT, respectivement IpaB/IpaC et SipB/SipC, la formation du translocon du SSTT nécessite également les protéines respectives IpaD et SipD (Clerc *et al.*, 1986 □ Kaniga *et al.*, 1995; Sansonetti *et al.*, 1986 □ Wood *et al.*, 1996 □ Ces protéines homologues IpaD et SipD, qui ne sont pas fonctionnellement interchangeables, ne présentent pas d'homologie de séquence significative avec PcrV et LcrV. Toutefois, l'analyse bio-informatique de la structure secondaire de IpaD et SipD, avec le programme COILS, prédit un motif de type «*coiled-coil*» dans la région centrale de ces protéines, comme dans les deux antigènes V (Picking *et al.*, 2005). Une étude récente de Picking *et al.* (2005) montre que IpaD intervient dans l'assemblage et/ou l'insertion du complexe hétéro-oligomérique IpaB/C (Picking *et al.*, 2005). Ce résultat suggère que IpaD et SipD sont, comme l'antigène V, des chaperones extracellulaires responsables de l'organisation structurale des protéines translocatrices propres à leur SSTT en un complexe hétéro-oligomérique, qui une fois inséré dans les membranes hôtes, génère le pore de translocation. Il serait intéressant de tester le pouvoir protecteur

d'anticorps spécifiques des protéines IpaD et SipD contre des infections à *Shigella* et à *Salmonella*.

## 5- Comment se réalise la translocation des protéines □ existence d'une translocase □

La translocation de protéines à travers une membrane, via un translocon, est un mécanisme très complexe qui nécessite une source d'énergie et une translocase pour le transport des protéines à travers le pore.

Prenons l'exemple d'un processus de translocation très bien connu, celui de la machinerie Sec. Ce système de sécrétion permet la sécrétion co-translationnelle de protéines non repliées à travers la membrane bactérienne interne (Prinz *et al.*, 2000 □ Veenendaal *et al.*, 2004; Zito et Oliver, 2003 □). Le translocon est un complexe tétramérique du trimère SecYEG (Manting *et al.*, 2000). La protéine SecA, qui est une ATPase, interagit d'une part avec le translocon et d'autre part, avec la pré-protéine. Lorsque SecA est associée à la pré-protéine à sécréter, elle fixe un ATP et s'insère en partie dans le canal du translocon. L'hydrolyse de l'ATP de SecA induit la translocation  $\approx 2,5$  kDa de la pré-protéine et la dé-insertion de SecA du translocon. Ensuite, SecA se réassocie à la pré-protéine, fixe un ATP, s'insère dans le translocon et transloque à nouveau  $\approx 2,5$  kDa de la pré-protéine lors de l'hydrolyse de l'ATP (Manting et Driessen, 2000 □ Vrontou et Economou, 2004). SecA agit donc comme un moteur qui fournit l'énergie nécessaire au passage des pré-protéines dans le translocon.

Au niveau des mitochondries, l'importation de protéines mitochondriales synthétisées dans le cytoplasme fait intervenir deux types de translocon: le TOM (Translocase of the outer membrane) qui permet le passage des protéines à travers la membrane mitochondriale externe et le TIM (Translocase of the innner membrane) qui transloque les protéines de l'espace intermembranaire dans la matrice mitochondriale. L'énergie nécessaire à la translocation des pré-protéines à travers le TIM provient de deux sources. D'une part, la différence de potentiel membranaire ( $\Delta\Psi$ ) permet la translocation des pré-séquences des pré-protéines à travers le TIM. La  $\Delta\Psi$ , qui est négative du côté matriciel, exerce un effet électrophorétique sur la pré-séquence chargée positivement (Martin *et al.*, 1991) et active le translocon TIM23 (Bauer *et al.*, 1996 □ Truscott *et al.*, 2001). D'autre part, au niveau de la matrice, un moteur ATP-dépendant interagit avec la pré-séquence et tire la pré-protéine dans la matrice mitochondriale (Glick, 1995; Pfanner et Wiedemann, 2002 □ Voisine *et al.*, 1999 □ Voos *et al.*, 1996 □). Ce

moteur est composé de mtHsp70 (matrix heat shock protein 70), d'une co-chaperone (facteur d'échange du nucléotide) Mge1 et de la protéine membranaire péripérique Tim44 (Pfanner et Geissler, 2001 ; Schatz et Dobberstein, 1996). De plus, la protéine mtHsp70 replie les protéines importées dans leur conformation fonctionnelle (Geissler *et al.*, 2001).

Le passage des protéines à travers le translocon du SSTT, inséré dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote, nécessite également de l'énergie. Il est probable que cette énergie soit apportée par la protéine de la famille YscN qui est une ATPase cytoplasmique apparentée aux sous-unités catalytiques des ATPases  $F_0F_1$  bactériennes. Cependant, on pourrait d'une part, envisager que le passage des effecteurs cytotoxiques à travers ce translocon soit assuré par un élément dynamique du canal de translocation tel que cela a été proposé pour YopD dans le translocon de *Yersinia* spp. (Neyt et Cornelis, 1999a). D'autre part, il est également possible que des régions non-insérées du complexe hétéro-oligomérique forment des boucles protéiques, du côté cytoplasmique, capables d'aider le passage des effecteurs, via un changement de conformation. Enfin, on pourrait imaginer qu'une petite protéine du SSTT, facilite le passage des effecteurs dans le pore de translocation. En effet, il a été montré que LcrG est présente en petite quantité associée à la surface de la bactérie (Nilles *et al.*, 1998) et qu'elle est impliquée dans le processus de translocation (Sarker *et al.*, 1998b).

Le SSTT est capable de sécréter uniquement des protéines non repliées, ceci explique la nécessité pour la plupart des protéines effectrices d'interagir avec des protéines eucaryotes afin d'activer leur fonction catalytique.

## **6- Le translocon: une cible thérapeutique de choix ?**

L'utilisation des hématies comme modèle cellulaire nous a permis de mettre en évidence que les anticorps protecteurs anti-PcrV et anti-LcrV agissent de la même façon, en inhibant l'assemblage des protéines translocatrices en un complexe hétéro-oligomérique, complexe qui constitue le translocon du SSTT. Les épitopes protecteurs de LcrV et de PcrV ont probablement une structure tertiaire assez similaire. Cependant, la conformation tridimensionnelle de la région antigénique de LcrV doit contenir des motifs supplémentaires par rapport à celle de PcrV.

Afin de lutter contre l'émergence de nombreuses souches de bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques, le développement de thérapies alternatives est devenu très important. Ainsi, les connaissances des bases moléculaires et structurales du translocon du SSTT pourraient nous permettre à l'avenir de concevoir des «molécules anti-infectieuses» capables d'inhiber l'assemblage de celui-ci et ainsi empêcher le pouvoir cytotoxique de ces micro-organismes pathogènes.

Enfin, le modèle d'infection hématie/*P.aeruginosa* pourrait être utilisé pour cribler des molécules ou des anticorps qui affectent spécifiquement le translocon du SSTT.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

- Aebi, C., Bracher, R., Liechti-Gallati, S., Tschappeler, H., Rudeberg, A. et Kraemer, R. (1995). The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis--prognostic significance. *Eur J Pediatr* **154**, S69-73.
- Aizawa, S. I. (1996). Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **19**, 1-5.
- Aizawa, S. I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 157-164.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. et Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3928-3935.
- Aldridge, P. et Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-165.
- Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P. et Pier, G. B. (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* **68**, 3998-4004.
- Allmond, L. R., Karaca, T. J., Nguyen, V. N., Nguyen, T., Wiener-Kronish, J. P. et Sawa, T. (2003). Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the *pcrGVH-popBD* operon of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **71**, 2230-2233.
- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F. et McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1320-1324.
- Alonso, J. M., Vilmer, E., Mazigh, D. et Mollaret, H. H. (1980). Mechanisms of acquired resistance to plague in mice infected by *Yersinia enterocolitica* O:3. *Curr Microbiol* **4**, 117-122.
- Anderson, D. M., Fouts, D. E., Collmer, A. et Schneewind, O. (1999). Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12839-12843.
- Anderson, D. M., Ramamurthi, K. S., Tam, C. et Schneewind, O. (2002). YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to *yopQ* RNA. *J Bacteriol* **184**, 1287-1295.
- Anderson, D. M. et Schneewind, O. (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**, 1140-1143.
- Andersson, K., Carballeira, N., Magnusson, K. E., Persson, C., Stendahl, O., Wolf-Watz, H. et Fallman, M. (1996). YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**, 1057-1069.

## B

- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. et Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**, 475-485.
- Baltimore, R. S., Christie, C. D. et Smith, G. J. (1989). Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis* **140**, 1650-1661.
- Barbieri, J. T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int J Med Microbiol* **290**, 381-387.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. et Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295-304.



- Barker, A. P., Vasil, A. I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P. J. et Vasil, M. L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* **53**, 1089-1098.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W. et Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**, 33-41.
- Beijersbergen, A., Smith, S. J. et Hooykaas, P. J. (1994). Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **32**, 212-218.
- Bell, C. E. et Eisenberg, D. (1996). Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **35**, 1137-1149.
- Bennett, J. C. et Hughes, C. (2000). From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol* **8**, 202-204.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**, 393-404.
- Berthelot, P., Attree, I., Plesiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B. et Grattard, F. (2003). Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. *J Infect Dis* **188**, 512-518.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A. et Hugo, F. (1989). Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* **169**, 737-754.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. et Sziegleit, A. (1985). Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* **47**, 52-60.
- Birnboim, H. C. et Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Birtalan, S. C., Phillips, R. M. et Ghosh, P. (2002). Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**, 971-980.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. et Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. et Sansonetti, P. (1999). The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**, 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. et Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* **39**, 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K. et Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3027-3030.
- Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P. et Cornelis, G. R. (1996). Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *Embo J* **15**, 5191-5201.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. et McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Boyd, A. P., Lambermont, I. et Cornelis, G. R. (2000). Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-4821.

- Boyd, A. P., Sory, M. P., Iriarte, M. et Cornelis, G. R. (1998). Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the *Yersinia* Yop apparatus. *Mol Microbiol* **27**, 425-436.
- Bröms, J. E., Forslund, A. L., Forsberg, A. et Francis, M. S. (2003a). Dissection of homologous translocon operons reveals a distinct role for YopD in type III secretion by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* **149**, 2615-2626.
- Bröms, J. E., Forslund, A. L., Forsberg, A. et Francis, M. S. (2003b). PcrH of *Pseudomonas aeruginosa* Is Essential for Secretion and Assembly of the Type III Translocon. *J Infect Dis* **188**, 1910-1922.
- Bröms, J. E., Sundin, C., Francis, M. S. et Forsberg, A. (2003c). Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **188**, 239-249.
- Bruno, T. F., Buser, D. E., Syme, R. M., Woods, D. E. et Mody, C. H. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a mitogen but not a superantigen for human T lymphocytes. *Infect Immun* **66**, 3072-3079.
- Bruno, T. F., Woods, D. E. et Mody, C. H. (2000). Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in T lymphocytes. *J Leukoc Biol* **67**, 808-816.
- Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P. et Prince, A. (1998). Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**, 269-277.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. et Wiley, D. C. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37-43.
- Burkhard, P., Meier, M. et Lustig, A. (2000). Design of a minimal protein oligomerization domain by a structural approach. *Protein Sci* **9**, 2294-2301.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. et Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-88.
- Burns, D. L. (1999). Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**, 25-29.
- Burr, S. E., Stuber, K. et Frey, J. (2003). The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J Bacteriol* **185**, 6583-6591.
- Burr, S. E., Stuber, K., Wahli, T. et Frey, J. (2002). Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol* **184**, 5966-5970.
- Burrows, T. W. (1956). An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*. *Nature* **177**, 426-427.
- Burrows, T. W. et Bacon, G. A. (1958). The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis*. *Br J Exp Pathol* **39**, 278-291.
- Bye, M. R., Ewig, J. M. et Quittell, L. M. (1994). Cystic fibrosis. *Lung* **172**, 251-270.

## C

- Cambronne, E. D. et Schneewind, O. (2002). *Yersinia enterocolitica* type III secretion: *yscM1* and *yscM2* regulate *yop* gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of *yop* mRNA. *J Bacteriol* **184**, 5880-5893.
- Cascales, E. et Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**, 137-149.

- Chen, Y., Smith, M. R., Thirumalai, K. et Zychlinsky, A. (1996). A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *Embo J* **15**, 3853-3860.
- Cheng, L. W., Anderson, D. M. et Schneewind, O. (1997). Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **24**, 757-765.
- Cheng, L. W. et Schneewind, O. (2000). Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* **8**, 214-220.
- Chicurel, M. (2000). Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature* **408**, 284-286.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. et Schweizer, H. P. (2002). Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**, 760, 762-763.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. et Greenberg, E. P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2752-2757.
- Clerc, P., Baudry, B. et Sansonetti, P. J. (1986). Plasmid-mediated contact haemolytic activity in *Shigella* species: correlation with penetration into HeLa cells. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137A**, 267-278.
- Coburn, J., Kane, A. V., Feig, L. et Gill, D. M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* **266**, 6438-6446.
- Cohen, C. et Parry, D. A. (1990). Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* **7**, 1-15.
- Collier, R. J. (1975). Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* **39**, 54-85.
- Comolli, J. C., Waite, L. L., Mostov, K. E. et Engel, J. N. (1999). Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **67**, 3207-3214.
- Cornelis, G. R. (1998). The *Yersinia* Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense. *Folia Microbiol (Praha)* **43**, 253-261.
- Cornelis, G. R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 742-752.
- Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P. et Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1315-1352.
- Cornelis, G. R. et Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735-774.
- Cornelis, G. R. et Wolf-Watz, H. (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**, 861-867.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. et Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Crago, A. M. et Koronakis, V. (1998). *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* **30**, 47-56.
- Cryz, S. J., Jr., Pitt, T. L., Furer, E. et Germanier, R. (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **44**, 508-513.

## D

- D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. et Manoil, C. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* **183**, 1466-1471.

- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. et Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**, 6164-6167.
- Dacheux, D., Attree, I. et Toussaint, B. (2001a). Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun* **69**, 538-542.
- Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., Polack, B. et Toussaint, B. (2002). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon. *Infect Immun* **70**, 3973-3977.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. et Attree, I. (2001b). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**, 76-85.
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J. et Attree, I. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**, 2916-2924.
- Darling, K. E., Dewar, A. et Evans, T. J. (2004). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**, 521-533.
- Darwin, K. H. et Miller, V. L. (2001). Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *Embo J* **20**, 1850-1862.
- Dasgupta, N., Lykken, G. L., Wolfgang, M. C. et Yahr, T. L. (2004). A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**, 297-308.
- Dasgupta, T., de Kievit, T. R., Masoud, H., Altman, E., Richards, J. C., Sadovskaya, I., Speert, D. P. et Lam, J. S. (1994). Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *Infect Immun* **62**, 809-817.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. et O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 1027-1036.
- de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M. C. et Puchelle, E. (1996). Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **64**, 1582-1588.
- De Geyter, C., Wattiez, R., Sansonetti, P., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M., Parsot, C. et Cabiaux, V. (2000). Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur J Biochem* **267**, 5769-5776.
- DeBord, K. L., Lee, V. T. et Schneewind, O. (2001). Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **183**, 4588-4598.
- Deitch, E. A., Dobke, M. et Baxter, C. R. (1985). Failure of local immunity. A potential cause of burn wound sepsis. *Arch Surg* **120**, 78-84.
- Deng, W. L. et Huang, H. C. (1999). Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. *J Bacteriol* **181**, 2298-2301.
- Derewenda, U., Mateja, A., Devedjiev, Y., Routzahn, K. M., Evdokimov, A. G., Derewenda, Z. S. et Waugh, D. S. (2004). The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure (Camb)* **12**, 301-306.
- Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 1-11.

Dinh, T., Paulsen, I. T. et Saier, M. H., Jr. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176**, 3825-3831.

## E

Egger, L. A., Park, H. et Inouye, M. (1997). Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* **2**, 167-184.

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

Epelman, S., Bruno, T. F., Neely, G. G., Woods, D. E. et Mody, C. H. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect Immun* **68**, 4811-4814.

Epelman, S., Neely, G. G., Ma, L. L., Gjomarkaj, M., Pace, E., Melis, M., Woods, D. E. et Mody, C. H. (2002). Distinct fates of monocytes and T cells directly activated by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Leukoc Biol* **71**, 458-468.

Epelman, S., Stack, D., Bell, C., Wong, E., Neely, G. G., Krutzik, S., Miyake, K., Kubes, P., Zbytniuk, L. D., Ma, L. L., Xie, X., Woods, D. E. et Mody, C. H. (2004). Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol* **173**, 2031-2040.

## F

Farah, C. S. et Reinach, F. C. (1999). Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5-hydroxytryptophan: Ca<sup>2+</sup>-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. *Biochemistry* **38**, 10543-10551.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. et Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**, 43-51.

Feldman, M. F. et Cornelis, G. R. (2003). The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**, 151-158.

Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. et Cornelis, G. R. (2002). SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**, 1183-1197.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. et Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**, 2659-2669.

Fields, K. A. et Straley, S. C. (1999). LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism. *Infect Immun* **67**, 4801-4813.

Filloux, A., Michel, G. et Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 177-198.

Filloux, A. et Vallet, I. (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* **19**, 77-83.

Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. et Frank, D. W. (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* **25**, 547-557.

Finlay, B. B. et Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-725.

- FitzGerald, D., Morris, R. E. et Saelinger, C. B. (1980). Receptor-mediated internalization of *Pseudomonas* toxin by mouse fibroblasts. *Cell* **21**, 867-873.
- Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J. P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K. E., Kanada, D., Sawa, T., Yen, T. S. et Frank, D. W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun* **65**, 579-586.
- Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., Preston, M. J., Grout, M., Evans, D. J. et Pier, G. B. (1996). Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**, 2288-2294.
- Foley, B. T., Moehring, J. M. et Moehring, T. J. (1995). Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A. Genetic and biochemical analyses. *J Biol Chem* **270**, 23218-23225.
- Forsberg, A., Bolin, I., Norlander, L. et Wolf-Watz, H. (1987). Molecular cloning and expression of calcium-regulated, plasmid-coded proteins of *Y. pseudotuberculosis*. *Microb Pathog* **2**, 123-137.
- Forsberg, A., Viitanen, A. M., Skurnik, M. et Wolf-Watz, H. (1991). The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**, 977-986.
- Foultier, B., Troisfontaines, P., Muller, S., Opperdoes, F. R. et Cornelis, G. R. (2002). Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol* **55**, 37-51.
- Francis, M. S., Lloyd, S. A. et Wolf-Watz, H. (2001). The type III secretion chaperone LcrH cooperates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **42**, 1075-1093.
- Francis, M. S. et Wolf-Watz, H. (1998). YopD of *Yersinia pseudotuberculosis* is translocated into the cytosol of HeLa epithelial cells: evidence of a structural domain necessary for translocation. *Mol Microbiol* **29**, 799-813.
- Francis, M. S., Wolf-Watz, H. et Forsberg, A. (2002). Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **5**, 166-172.
- Frank, D. W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**, 621-629.
- Frank, D. W. et Iglewski, B. H. (1991). Cloning and sequence analysis of a *trans*-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**, 6460-6468.
- Frank, D. W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J. P., Roy-Burman, A., Spack, E. G., Mullaney, B. P., Megdoud, M., Marks, J. D., Fritz, R. et Sawa, T. (2002). Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* **186**, 64-73.
- Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R. et Forsberg, A. (1997). Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol Microbiol* **25**, 1125-1139.
- Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R. et Forsberg, A. (1998). Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**, 1155-1165.
- Fu, H., Coburn, J. et Collier, R. J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2320-2324.

## G

- Galan, J. E. et Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Gallant, C. V., Raivio, T. L., Olson, J. C., Woods, D. E. et Storey, D. G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. *Microbiology* **146** ( Pt 8), 1891-1899.
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol* **5**, 2315-2321.
- Ganesan, A. K., Frank, D. W., Misra, R. P., Schmidt, G. et Barbieri, J. T. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* **273**, 7332-7337.
- Ganesan, A. K., Mende-Mueller, L., Selzer, J. et Barbieri, J. T. (1999a). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a double ADP-ribosyltransferase, resembles vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem* **274**, 9503-9508.
- Ganesan, A. K., Vincent, T. S., Olson, J. C. et Barbieri, J. T. (1999b). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. *J Biol Chem* **274**, 21823-21829.
- Geissler, A., Rassow, J., Pfanner, N. et Voos, W. (2001). Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix Hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol Cell Biol* **21**, 7097-7104.
- Gilljam, H., Ellin, A. et Strandvik, B. (1989). Increased bronchial chloride concentration in cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest* **49**, 121-124.
- Glick, B. S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* **80**, 11-14.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. et Barbieri, J. T. (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**, 36369-36372.
- Goldberg, J. B. et Pier, G. B. (2000). The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* **8**, 514-520.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. et Wilson, J. M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S. et Lory, S. (2004). A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**, 745-754.
- Gophna, U., Ron, E. Z. et Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**, 151-163.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. et Attree, I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**, 4741-4750.
- Govan, J. R. et Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539-574.
- Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R. et Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* **9**, 322-330.
- Guichon, A., Hersh, D., Smith, M. R. et Zychlinsky, A. (2001). Structure-function analysis of the *Shigella* virulence factor IpaB. *J Bacteriol* **183**, 1269-1276.

Gupta, S. K., Berk, R. S., Masinick, S. et Hazlett, L. D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* **62**, 4572-4579.

## H

Ha, U. H., Kim, J., Badrane, H., Jia, J., Baker, H. V., Wu, D. et Jin, S. (2004). An *in vivo* inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system. *Mol Microbiol* **54**, 307-320.

Hahn, H. P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **192**, 99-108.

Hakansson, S., Bergman, T., Vanooteghem, J. C., Cornelis, G. et Wolf-Watz, H. (1993). YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* **61**, 71-80.

Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homble, F. et Wolf-Watz, H. (1996). The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* **15**, 5812-5823.

Hall, A. et Nobes, C. D. (2000). Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 965-970.

Hancock, R. E., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P. et Pier, G. B. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* **42**, 170-177.

Hartland, E. L. et Robins-Browne, R. M. (1998). *In vitro* association between the virulence proteins, YopD and YopE, of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett* **162**, 207-213.

Hauser, A. R., Fleiszig, S., Kang, P. J., Mostov, K. et Engel, J. N. (1998). Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect Immun* **66**, 1413-1420.

Hauser, G. et Karnovsky, M. L. (1957). Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **224**, 91-105.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. et Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.

Hayward, R. D., Hume, P. J., McGhie, E. J. et Koronakis, V. (2002). A *Salmonella* SipB-derived polypeptide blocks the 'trigger' mechanism of bacterial entry into eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **45**, 1715-1727.

Hayward, R. D. et Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *Embo J* **18**, 4926-4934.

Hayward, R. D., McGhie, E. J. et Koronakis, V. (2000). Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol Microbiol* **37**, 727-739.

Heck, L. W., Alarcon, P. G., Kulhavy, R. M., Morihara, K., Russell, M. W. et Mestecky, J. F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* **144**, 2253-2257.

Heck, L. W., Morihara, K., McRae, W. B. et Miller, E. J. (1986). Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* **51**, 115-118.

Henriksson, M. L., Francis, M. S., Peden, A., Aili, M., Stefansson, K., Palmer, R., Aitken, A. et Hallberg, B. (2002). A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional *in vivo*. *Eur J Biochem* **269**, 4921-4929.



- Henriksson, M. L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H. et Hallberg, B. (2000). Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited *in vivo* by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem J* **347 Pt 1**, 217-222.
- Hermant, D., Menard, R., Arricau, N., Parsot, C. et Popoff, M. Y. (1995). Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* **17**, 781-789.
- Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. et Brown, M. S. (1990). Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a *trans*-Golgi compartment. *Embo J* **9**, 1769-1776.
- Hilbi, H., Chen, Y., Thirumalai, K. et Zychlinsky, A. (1997). The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **65**, 5165-5170.
- Hill, J., Leary, S. E., Griffin, K. F., Williamson, E. D. et Titball, R. W. (1997). Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect Immun* **65**, 4476-4482.
- Hogan, D. A. et Kolter, R. (2002). *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* **296**, 2229-2232.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L. et Heesemann, J. (2004). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* **150**, 843-851.
- Hollings, A. E., Granstrom, M., Vasil, M. L., Wretling, B. et Strandvik, B. (1987). Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **25**, 1868-1874.
- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., Benz, R., Wolf-Watz, H. et Forsberg, A. (2001). LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**, 620-632.
- Hong, Y. Q. et Ghebrehwet, B. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* **62**, 133-138.
- Hovey, A. K. et Frank, D. W. (1995). Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **177**, 4427-4436.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Hume, P. J., McGhie, E. J., Hayward, R. D. et Koronakis, V. (2003). The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology. *Mol Microbiol* **49**, 425-439.

## I

- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. et Schmidt, M. A. (2001). Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 669-679.
- Iglewski, B. H. et Kabat, D. (1975). NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2284-2288.
- Iglewski, B. H., Liu, P. V. et Kabat, D. (1977). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* **15**, 138-144.

Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J. et Maxwell, E. S. (1978). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3211-3215.

Iglewski, B. H. et Sadoff, J. C. (1979). Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Methods Enzymol* **60**, 780-793.

Imler, J. L. et Zheng, L. (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* **75**, 18-26.

Imundo, L., Barasch, J., Prince, A. et Al-Awqati, Q. (1995). Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3019-3023.

## J

Jander, G., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**, 3843-3845.

Jap, B. K. et Walian, P. J. (1996). Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev* **76**, 1073-1088.

Jenkins, C. E., Swiatoniowski, A., Issekutz, A. C. et Lin, T. J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**, 37201-37207.

Jensen, E. T., Kharazmi, A., Lam, K., Costerton, J. W. et Hoiby, N. (1990). Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect Immun* **58**, 2383-2385.

Jesaitis, A. J., Franklin, M. J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C. I., Bleazard, J. B., Duffy, J. E., Beyenal, H. et Lewandowski, Z. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* **171**, 4329-4339.

Johansen, K. A., Gill, R. E. et Vasil, M. L. (1996). Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect Immun* **64**, 3259-3266.

Joris, L., Dab, I. et Quinton, P. M. (1993). Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev Respir Dis* **148**, 1633-1637.

Journet, L., Agrain, C., Broz, P. et Cornelis, G. R. (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**, 1757-1760.

## K

Kaniga, K., Trollinger, D. et Galan, J. E. (1995). Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* **177**, 7078-7085.

Kasai, N., Arata, S., Mashimo, J., Akiyama, Y., Tanaka, C., Egawa, K. et Tanaka, S. (1987). *Pseudomonas diminuta* LPS with a new endotoxic lipid A structure. *Biochem Biophys Res Commun* **142**, 972-978.

Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. et Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073-1080.

Kharazmi, A., Giwercman, B. et Hoiby, N. (1999). Robbins device in biofilm research. *Methods Enzymol* **310**, 207-215.

- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. et Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Konyecsni, W. M. et Deretic, V. (1988). Broad-host-range plasmid and M13 bacteriophage-derived vectors for promoter analysis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **74**, 375-386.
- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R. et Tommassen, J. (1997). The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**, 789-797.
- Kownatzki, R., Tummler, B. et Doring, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* **1**, 1026-1027.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K. J. et Barbieri, J. T. (2002). *In vivo* rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun* **70**, 360-367.
- Krylov, D., Barchi, J. et Vinson, C. (1998). Inter-helical interactions in the leucine zipper coiled coil dimer: pH and salt dependence of coupling energy between charged amino acids. *J Mol Biol* **279**, 959-972.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. et Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. et Galan, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10225-10230.
- Kueltzo, L. A., Osiecki, J., Barker, J., Picking, W. L., Ersoy, B., Picking, W. D. et Middaugh, C. R. (2003). Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**, 2792-2798.

## L

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P. et van der Goot, F. G. (2002). Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J* **21**, 4449-4457.
- Lam, M. Y., McGroarty, E. J., Kropinski, A. M., MacDonald, L. A., Pedersen, S. S., Hoiby, N. et Lam, J. S. (1989). Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **27**, 962-967.
- Lang, S. et Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids--biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 22-32.
- Laskowski, M. A., Osborn, E. et Kazmierczak, B. I. (2004). A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **54**, 1090-1103.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. et Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-1146.
- Lawton, W. D. et Surgalla, M. J. (1963). Immunization against Plague by a Specific Fraction of *Pasteurella Pseudotuberculosis*. *J Infect Dis* **113**, 39-42.

- Lazdunski, A. (1998). Les facteurs de virulences de *Pseudomonas aeruginosa* et leur régulation. *Med Mal Infect* **2S**, 109-118.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. et Lazdunski, A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* **48**, 199-210.
- Lee, V. T., Tam, C. et Schneewind, O. (2000). LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem* **275**, 36869-36875.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. et Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Li, J. D., Dohrman, A. F., Gallup, M., Miyata, S., Gum, J. R., Kim, Y. S., Nadel, J. A., Prince, A. et Basbaum, C. B. (1997). Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 967-972.
- Liang, W., Warrick, H. M. et Spudich, J. A. (1999). A structural model for phosphorylation control of *Dictyostelium* myosin II thick filament assembly. *J Cell Biol* **147**, 1039-1048.
- Liu, P. V. (1974). Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130 Suppl**, S94-99.
- Liu, S., Kulich, S. M. et Barbieri, J. T. (1996). Identification of glutamic acid 381 as a candidate active site residue of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Biochemistry* **35**, 2754-2758.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. et Wolf-Watz, H. (2001). *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**, 520-531.
- Lloyd, S. A., Sjostrom, M., Andersson, S. et Wolf-Watz, H. (2002). Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol* **43**, 51-59.
- Lomholt, J. A., Poulsen, K. et Kilian, M. (2001). Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun* **69**, 6284-6295.
- Luberto, C., Stonehouse, M. J., Collins, E. A., Marchesini, N., El-Bawab, S., Vasil, A. I., Vasil, M. L. et Hannun, Y. A. (2003). Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. PlcH is a multifunctional enzyme. *J Biol Chem* **278**, 32733-32743.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-382.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. et Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.
- Lynn, W. A. et Golenbock, D. T. (1992). Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* **13**, 271-276.

## M

- Mackman, N., Baker, K., Gray, L., Haigh, R., Nicaud, J. M. et Holland, I. B. (1987). Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *Embo J* **6**, 2835-2841.
- Macnab, R. M. (1996). Flagella and motility. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed ASM Press, Washington, DC, 123-145.
- Macnab, R. M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol* **181**, 7149-7153.

- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**, 47-56.
- Maier, R. M. et Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 625-633.
- Manes, S., del Real, G. et Martinez, A. C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**, 557-568.
- Manting, E. H. et Driessen, A. J. (2000). *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**, 226-238.
- Manting, E. H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. et Driessen, A. J. (2000). SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *Embo J* **19**, 852-861.
- Marenne, M. N., Journet, L., Mota, L. J. et Cornelis, G. R. (2003). Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* **35**, 243-258.
- Martin, J., Mahlke, K. et Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* **266**, 18051-18057.
- Matson, J. S. et Nilles, M. L. (2001). LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **183**, 5082-5091.
- Matson, J. S. et Nilles, M. L. (2002). Interaction of the *Yersinia pestis* type III regulatory proteins LcrG and LcrV occurs at a hydrophobic interface. *BMC Microbiol* **2**, 16.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.
- Mavris, M., Page, A. L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P. et Parsot, C. (2002a). Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol* **43**, 1543-1553.
- Mavris, M., Sansonetti, P. J. et Parsot, C. (2002b). Identification of the cis-acting site involved in activation of promoters regulated by activity of the type III secretion apparatus in *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **184**, 6751-6759.
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K. et Yahr, T. L. (2002). ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* **46**, 1123-1133.
- McClure, C. D. et Schiller, N. L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* **33**, 109-117.
- McGhie, E. J., Hume, P. J., Hayward, R. D., Torres, J. et Koronakis, V. (2002). Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol Microbiol* **44**, 1309-1321.
- McNamara, N., Khong, A., McKemy, D., Caterina, M., Boyer, J., Julius, D. et Basbaum, C. (2001). ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9086-9091.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A. et Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 5165-5175.
- Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. et Vasselon, T. (1994). Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**, 515-525.
- Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S. et Welch, R. (1994a). Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* **87**, 249-267.
- Menestrina, G., Schiavo, G. et Montecucco, C. (1994b). Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Mol Aspects Med* **15**, 79-193.

- Michel, G., Ball, G., Goldberg, J. B. et Lazdunski, A. (2000). Alteration of the lipopolysaccharide structure affects the functioning of the Xcp secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 696-703.
- Miller, V. L. (2002). Connections between transcriptional regulation and type III secretion? *Curr Opin Microbiol* **5**, 211-215.
- Mimori-Kiyosue, Y., Vonderviszt, F. et Namba, K. (1997). Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymerization and polymorphism. *J Mol Biol* **270**, 222-237.
- Mody, C. H., Buser, D. E., Syme, R. M. et Woods, D. E. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces proliferation of human T lymphocytes. *Infect Immun* **63**, 1800-1805.
- Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C. et Holder, I. A. (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun* **38**, 1296-1298.
- Moss, J., Ehrmantraut, M. E., Banwart, B. D., Frank, D. W. et Barbieri, J. T. (2001). Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infect Immun* **69**, 1185-1188.
- Motin, V. L., Nakajima, R., Smirnov, G. B. et Brubaker, R. R. (1994). Passive immunity to *yersiniae* mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect Immun* **62**, 4192-4201.
- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S. et Macnab, R. M. (1999). Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J Bacteriol* **181**, 5808-5813.

## N

- Nakajima, R., Motin, V. L. et Brubaker, R. R. (1995). Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect Immun* **63**, 3021-3029.
- Nanao, M., Ricard-Blum, S., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Lascoux, D., Chabert, J., Attree, I. et Dessen, A. (2003). Type III secretion proteins PcrV and PcrG from *Pseudomonas aeruginosa* form a 1:1 complex through high affinity interactions. *BMC Microbiol* **3**, 21.
- Nedialkov, Y. A., Motin, V. L. et Brubaker, R. R. (1997). Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect Immun* **65**, 1196-1203.
- Neyt, C. et Cornelis, G. R. (1999a). Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **33**, 971-981.
- Neyt, C. et Cornelis, G. R. (1999b). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* **31**, 143-156.
- Nilles, M. L., Fields, K. A. et Straley, S. C. (1998). The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J Bacteriol* **180**, 3410-3420.
- Nilles, M. L., Williams, A. W., Skrzypek, E. et Straley, S. C. (1997). *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca<sup>2+</sup> response. *J Bacteriol* **179**, 1307-1316.
- Nobes, C. D. et Hall, A. (1995a). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**, 456-459.

Nobes, C. D. et Hall, A. (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.

Nordfelth, R. et Wolf-Watz, H. (2001). YopB of *Yersinia enterocolitica* is essential for YopE translocation. *Infect Immun* **69**, 3516-3518.

Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D. B., Amersdorfer, P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., Sheridan, R., Blake, R., Smith, L. A. et Marks, J. D. (2002). Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11346-11350.

## O

O'Toole, G. A. et Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.

Ochsner, U. A., Fiechter, A. et Reiser, J. (1994a). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnopolysaccharide transferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* **269**, 19787-19795.

Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. et Reiser, J. (1994b). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 2044-2054.

Ochsner, U. A. et Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6424-6428.

Osiecki, J. C., Barker, J., Picking, W. L., Serfis, A. B., Berring, E., Shah, S., Harrington, A. et Picking, W. D. (2001). IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Mol Microbiol* **42**, 469-481.

Ostroff, R. M., Vasil, A. I. et Vasil, M. L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**, 5915-5923.

Ostroff, R. M. et Vasil, M. L. (1987). Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **169**, 4597-4601.

Ostroff, R. M., Wretling, B. et Vasil, M. L. (1989). Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect Immun* **57**, 1369-1373.

## P

Page, A. L. et Parsot, C. (2002). Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* **46**, 1-11.

Pallen, M. J., Dougan, G. et Frankel, G. (1997). Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. *Mol Microbiol* **25**, 423-425.

Palmer, M., Harris, R., Freytag, C., Kehoe, M., Tranum-Jensen, J. et Bhakdi, S. (1998). Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *Embo J* **17**, 1598-1605.

Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D. et Tainer, J. A. (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**, 32-38.

- Parsek, M. R. et Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8789-8793.
- Parsot, C., Hamiaux, C. et Page, A. L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**, 7-14.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. et Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.
- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F. et Koch, C. (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* **47**, 6-13.
- Pederson, K. J., Krall, R., Riese, M. J. et Barbieri, J. T. (2002). Intracellular localization modulates targeting of ExoS, a type III cytotoxin, to eukaryotic signalling proteins. *Mol Microbiol* **46**, 1381-1390.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. et Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127-3132.
- Pettersson, J., Holmstrom, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., von Euler-Matell, A., Carlsson, E., Titball, R., Forsberg, A. et Wolf-Watz, H. (1999). The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**, 961-976.
- Pfanner, N. et Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 339-349.
- Pfanner, N. et Wiedemann, N. (2002). Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 400-411.
- Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Aaron Baxter, M., Harrington, A. T., Blocker, A. et Picking, W. D. (2005). IpaD of *Shigella* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun* **sous-pressé**.
- Pier, G. B. (2002). CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol* **5**, 81-86.
- Pier, G. B., Grout, M. et Zaidi, T. S. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12088-12093.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R. et Goldberg, J. B. (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* **271**, 64-67.
- Plano, G. V., Day, J. B. et Ferracci, F. (2001). Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* **40**, 284-293.
- Plotkowski, M. C., Chevillard, M., Pierrot, D., Altemayer, D., Zahm, J. M., Colliot, G. et Puchelle, E. (1991). Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture. *J Clin Invest* **87**, 2018-2028.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T. A., Hartmann, E. et Kalies, K. U. (2000). Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J* **19**, 1900-1906.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
- Pukatzi, S., Kessin, R. H. et Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3159-3164.



## R

- Radke, J., Pederson, K. J. et Barbieri, J. T. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a biglutamic acid ADP-ribosyltransferase. *Infect Immun* **67**, 1508-1510.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. et Soberon-Chavez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnolipase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**, 708-718.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. et Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**, 1899-1902.
- Ramamurthi, K. S. et Schneewind, O. (2002). *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. *J Bacteriol* **184**, 3321-3328.
- Ramamurthi, K. S. et Schneewind, O. (2003a). Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol Microbiol* **50**, 1095-1102.
- Ramamurthi, K. S. et Schneewind, O. (2003b). *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol* **50**, 1189-1198.
- Ratjen, F. et Doring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681-689.
- Read, R. C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V. et Taylor, G. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* **72**, 2271-2277.
- Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. et Haas, D. (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* **24**, 309-319.
- Rietsch, A., Wolfgang, M. C. et Mekalanos, J. J. (2004). Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **72**, 1383-1390.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Robinson, C. et Bolhuis, A. (2001). Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 350-356.
- Robinson, V. L., Buckler, D. R. et Stock, A. M. (2000). A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**, 626-633.
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. et Lam, J. S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 523-553.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. et Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**, 498-504.
- Roger, P., Puchelle, E., Bajolet-Laudinat, O., Tournier, J. M., Debordeaux, C., Plotkowski, M. C., Cohen, J. H., Sheppard, D. et de Bentzmann, S. (1999). Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* **13**, 1301-1309.
- Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Leitritz, L., Kessler, A. et Heesemann, J. (1997). Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect Immun* **65**, 446-451.
- Romling, U., Schmidt, K. D. et Tummeler, B. (1997). Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J Mol Biol* **271**, 386-404.

- Rosqvist, R., Magnusson, K. E. et Wolf-Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J* **13**, 964-972.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. et Bonas, U. (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9368-9373.
- Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. et Wiener-Kronish, J. P. (2001). Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* **183**, 1767-1774.
- Russmann, H., Kubori, T., Sauer, J. et Galan, J. E. (2002). Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. *Mol Microbiol* **46**, 769-779.

## S

- Saiman, L., Cacalano, G., Gruenert, D. et Prince, A. (1992). Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immun* **60**, 2808-2814.
- Saiman, L. et Prince, A. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* **92**, 1875-1880.
- Sambrook, J., Maniatis, T. et Fritsch, E. F. (1989). molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T. et Mounier, J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* **51**, 461-469.
- Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. et Cornelis, G. R. (1998a). The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**, 1207-1214.
- Sarker, M. R., Sory, M. P., Boyd, A. P., Iriarte, M. et Cornelis, G. R. (1998b). LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect Immun* **66**, 2976-2979.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R. M., Wiener-Kronish, J. et Sawa, T. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**, 2959-2969.
- Sato, K., Nakajima, R., Hara, F., Une, T. et Osada, Y. (1991). Preparation of monoclonal antibody to V antigen from *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol* **12**, 225-229.
- Sauer, F. G., Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S. D., Waksman, G. et Hultgren, S. J. (2000). Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 548-556.
- Sawa, T., Corry, D. B., Gropper, M. A., Ohara, M., Kurahashi, K. et Wiener-Kronish, J. P. (1997). IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol* **159**, 2858-2866.
- Sawa, T. et Wiener-Kronish, J. P. (2004). A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiol Clin North America* **22**, 591-606, viii-ix.
- Sawa, T., Yahr, T. L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M. A., Wiener-Kronish, J. P. et Frank, D. W. (1999). Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **5**, 392-398.
- Scaife, R. M., Courtneidge, S. A. et Langdon, W. Y. (2003). The multi-adaptor proto-oncoprotein Cbl is a key regulator of Rac and actin assembly. *J Cell Sci* **116**, 463-473.

- Schatz, G. et Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.
- Scherer, C. A., Cooper, E. et Miller, S. I. (2000). The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol Microbiol* **37**, 1133-1145.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. et Dessen, A. (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *Embo J* **22**, 4957-4967.
- Schweizer, H. D. (1993). Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechniques* **15**, 831-834.
- Schweizer, H. P. et Hoang, T. T. (1995). An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **158**, 15-22.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. et Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11638-11643.
- Sekiya, K., Satoh, R., Danbara, H. et Futaesaku, Y. (1993). A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J Bacteriol* **175**, 5953-5961.
- Shepard, L. A., Heuck, A. P., Hamman, B. D., Rossjohn, J., Parker, M. W., Ryan, K. R., Johnson, A. E. et Tweten, R. K. (1998). Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 14563-14574.
- Sherbrock-Cox, V., Russell, N. J. et Gacesa, P. (1984). The purification and chemical characterisation of the alginate present in extracellular material produced by mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr Res* **135**, 147-154.
- Shime, N., Sawa, T., Fujimoto, J., Faure, K., Allmond, L. R., Karaca, T., Swanson, B. L., Spack, E. G. et Wiener-Kronish, J. P. (2001). Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')(2) in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **167**, 5880-5886.
- Simons, K. et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K. et Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A. M. et Heesemann, J. (2002). *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **168**, 1315-1321.
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P. et Tran Van Nhieu, G. (2000). CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 19-33.
- Skrzypek, E. et Straley, S. C. (1993). LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **175**, 3520-3528.
- Skrzypek, E. et Straley, S. C. (1995). Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca<sup>2+</sup> response, and virulence of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **177**, 2530-2542.
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P. et Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**, 229-236.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. et Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-1253.

- Sory, M. P. et Cornelis, G. R. (1994). Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583-594.
- Stebbins, C. E. et Galan, J. E. (2001). Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77-81.
- Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., Chen, W., Lim, K. B., Hackett, M., Vasil, A. I. et Vasil, M. L. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* **46**, 661-676.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warren, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. et Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Strom, M. S. et Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* **47**, 565-596.
- Subtil, A., Parsot, C. et Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **39**, 792-800.
- Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs, P. V., Jr. et West, S. E. (2002). Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**, 1561-1569.
- Sun, J. et Barbieri, J. T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**, 32794-32800
- Sundin, C., Henriksson, M. L., Hallberg, B., Forsberg, A. et Frithz-Lindsten, E. (2001). Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell Microbiol* **3**, 237-246.
- Sundin, C., Wolfgang, M. C., Lory, S., Forsberg, A. et Frithz-Lindsten, E. (2002). Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **33**, 265-277.
- Sundin, C., Thelaus, J., Broms, J.E. et Forsberg, A. (2004). Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microb Pathog* **37**, 313-22.
- Suzuki, K., Doi, T., Imanishi, T., Kodama, T. et Tanaka, T. (1997). The conformation of the alpha-helical coiled coil domain of macrophage scavenger receptor is pH dependent. *Biochemistry* **36**, 15140-15146.
- Szilak, L., Moitra, J. et Vinson, C. (1997). Design of a leucine zipper coiled coil stabilized 1.4 kcal mol<sup>-1</sup> by phosphorylation of a serine in the e position. *Protein Sci* **6**, 1273-1283.

## T

- Tager, A. M., Wu, J. et Vermeulen, M. W. (1998). The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**, 643-652.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. et Sasakawa, C. (2000). Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* **19**, 3876-3887.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. et Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805-816.

- Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B. et Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* **64**, 37-43.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G. R., Ruyschaert, J. M. et Cabiliaux, V. (1999). *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *Embo J* **18**, 6793-6799.
- Thanassi, D. G. et Hultgren, S. J. (2000). Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. *Methods* **20**, 111-126.
- Thomas, N. A. et Finlay, B. B. (2004). Pathogens: bacterial needles ruled to length and specificity. *Curr Biol* **14**, R192-194.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. et Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **9**, 73-90.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I. et Vignais, P. M. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 416-421.
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A. et Sansonetti, P. J. (1999). IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J* **18**, 3249-3262.
- Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N. et Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* **8**, 1074-1082.
- Tucker, S. C. et Galan, J. E. (2000). Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* serovar typhimurium type III secretion-associated chaperone. *J Bacteriol* **182**, 2262-2268.
- Tweten, R. K., Parker, M. W. et Johnson, A. E. (2001). The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**, 15-33.

## U

- Une, T. et Brubaker, R. R. (1984). Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *yersiniae*. *J Immunol* **133**, 2226-2230.

## V

- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A. et Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6911-6916.
- Vallis, A. J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. et Frank, D. W. (1999). Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* **67**, 2040-2044.
- Van Der Goot, F. G. et Harder, T. (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* **13**, 89-97.
- Van Der Goot, F. G., Tran Van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P. et Lafont, F. (2004). Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J Biol Chem*.
- Vasil, M. L., Kabat, D. et Iglewski, B. H. (1977). Structure-activity relationships of an exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **16**, 353-361.

- Veenendaal, A. K., van der Does, C. et Driessen, A. J. (2004). The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 81-95.
- Viboud, G. I., So, S. S., Ryndak, M. B. et Bliska, J. B. (2003). Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **47**, 1305-1315.
- Vincent, T. S., Fraylick, J. E., McGuffie, E. M. et Olson, J. C. (1999). ADP-ribosylation of oncogenic Ras proteins by *pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S *in vivo*. *Mol Microbiol* **32**, 1054-1064.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J. et Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol* **28**, 1381-1389.
- Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N. et Voos, W. (1999). The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* **97**, 565-574.
- Volz, K. (1993). Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* **32**, 11741-11753.
- Voos, W., von Ahsen, O., Muller, H., Guiard, B., Rassow, J. et Pfanner, N. (1996). Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *Embo J* **15**, 2668-2677.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. et Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**, 6735-6741.
- Vrontou, E. et Economou, A. (2004). Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 67-80.

## W

- Wachter, C., Beinke, C., Mattes, M. et Schmidt, M. A. (1999). Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**, 1695-1707.
- Wake, A., Morita, H. et Wake, M. (1978). Mechanisms of long and short term immunity to plague. *Immunology* **34**, 1045-1052.
- Wake, A. et Sutoh, Y. (1983). Mechanisms of protection against virulent *Yersinia pestis* infection without participation of humoral antibody: H-2 restriction in athymic mouse model. *Curr Microbiol* **8**, 79-84.
- Wall, D. et Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**, 1-10.
- Waterfield, N. R., Daborn, P. J. et French-Constant, R. H. (2002). Genomic islands in *Photobacterium*. *Trends Microbiol* **10**, 541-545.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. et Cornelis, G. R. (1994). Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10493-10497.
- Wattiau, P. et Cornelis, G. R. (1993). SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol Microbiol* **8**, 123-131.
- Welkos, S., Friedlander, A., McDowell, D., Weeks, J. et Tobery, S. (1998). V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb Pathog* **24**, 185-196.
- Whiteley, M., Ott, J. R., Weaver, E. A. et McLean, R. J. (2001). Effects of community composition and growth rate on aquifer biofilm bacteria and their susceptibility to betadine disinfection. *Environ Microbiol* **3**, 43-52.
- Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G. et Iglewski, B. H. (1990). Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol* **44**, 335-363.

- Williams, A. W. et Straley, S. C. (1998). YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. *J Bacteriol* **180**, 350-358.
- Wills, P. J., Hall, R. L., Chan, W. et Cole, P. J. (1997). Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *J Clin Invest* **99**, 9-13.
- Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G. et Rosenshine, I. (1998). Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**, 143-155.
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G. et Lory, S. (2003a). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8484-8489.
- Wolfgang, M. C., Lee, V. T., Gilmore, M. E. et Lory, S. (2003b). Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**, 253-263.
- Wood, M. W., Rosqvist, R., Mullan, P. B., Edwards, M. H. et Galyov, E. E. (1996). SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol* **22**, 327-338.
- Woods, D. E., Hwang, W. S., Shahrabadi, M. S. et Que, J. U. (1988). Alteration of pulmonary structure by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Med Microbiol* **26**, 133-141.
- Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H. V. et Jin, S. (2004). MucA-Mediated Coordination of Type III Secretion and Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**, 7575-7585.

## X

- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. et Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**, 723-732.

## Y

- Yahr, T. L. et Frank, D. W. (1994). Transcriptional organization of the *trans*-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 3832-3838.
- Yahr, T. L., Goranson, J. et Frank, D. W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* **22**, 991-1003.
- Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. M. et Frank, D. W. (1995). Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* **177**, 1169-1178.
- Yahr, T. L., Mende-Mueller, L. M., Friese, M. B. et Frank, D. W. (1997). Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **179**, 7165-7168.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. et Frank, D. W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13899-13904.
- Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D. G., DeRosier, D. J., Vonderviszt, F., Imada, K. et Namba, K. (2000). The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**, 2148-2152.
- Young, B. M. et Young, G. M. (2002). YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **184**, 1324-1334.
- Young, G. M., Schmiel, D. H. et Miller, V. L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6456-6461.

## Z

Zaidi, T. S., Fleiszig, S. M., Preston, M. J., Goldberg, J. B. et Pier, G. B. (1996). Lipopolysaccharide outer core is a ligand for corneal cell binding and ingestion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 976-986.

Zielenski, J. (2000). Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* **67**, 117-133.

Zito, C. R. et Oliver, D. (2003). Two-stage binding of SecA to the bacterial translocon regulates ribosome-translocon interaction. *J Biol Chem* **278**, 40640-40646.

Zuckert, W. R., Marquis, H. et Goldfine, H. (1998). Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect Immun* **66**, 4823-4831.

Zychlinsky, A., Fitting, C., Cavaillon, J. M. et Sansonetti, P. J. (1994). Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest* **94**, 1328-1332.





# ANNEXES



# ANNEXE 1

Article 1: Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y. et Attree I. (2001).

Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.*, **40**(1), 76-85.



# Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages

Denis Dacheux,<sup>1†</sup> Julien Goure,<sup>1</sup> Jacqueline Chabert,<sup>1</sup> Yves Usson<sup>2</sup> and Ina Attree<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (UMR-5092 CNRS/CEA/UJF), DBMS, CEA, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France.

<sup>2</sup>Laboratoire DyOGen, Institut Albert Bonniot, La Tronche, France.

## Summary

The *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA induces type III secretion system-dependent but ExoU-independent oncosis of neutrophils and macrophages. Time-lapse microscopy of the infection process revealed the rapid accumulation of motile bacteria around infected cells undergoing the process of oncosis, a phenomenon we termed pack swarming. Characterization of the non-chemotactic CHAcheZ mutant showed that pack swarming is a bacterial chemotactic response to infected macrophages. A non-cytotoxic mutant, lacking the type III-secreted proteins PcrV, PopB and PopD, was able to pack swarm only in the presence of the parental strain CHA or when macrophages were pretreated with the pore-forming toxin streptolysin O. Interaction of *P. aeruginosa* with red blood cells (RBCs) showed that the contact-dependent haemolysis provoked by CHA requires secretion via the type III system and the PcrV, PopB/PopD proteins. The pore inserted into RBC membrane was estimated from osmoprotection experiments to be between 2.8 and 3.5 nm. CHA-infected macrophages could be protected from cell lysis with PEG3350, indicating that the pore introduced into RBC and macrophage membranes is of similar size. The time course uptake of the vital fluorescent dye, Yo-Pro-1, into infected macrophages confirmed that the formation of transmembrane pores by CHA precedes cellular oncosis. Therefore, CHA-induced macrophage death results

from a pore-forming activity that is dependent on the intact *pcrGVHpopBD* operon.

## Introduction

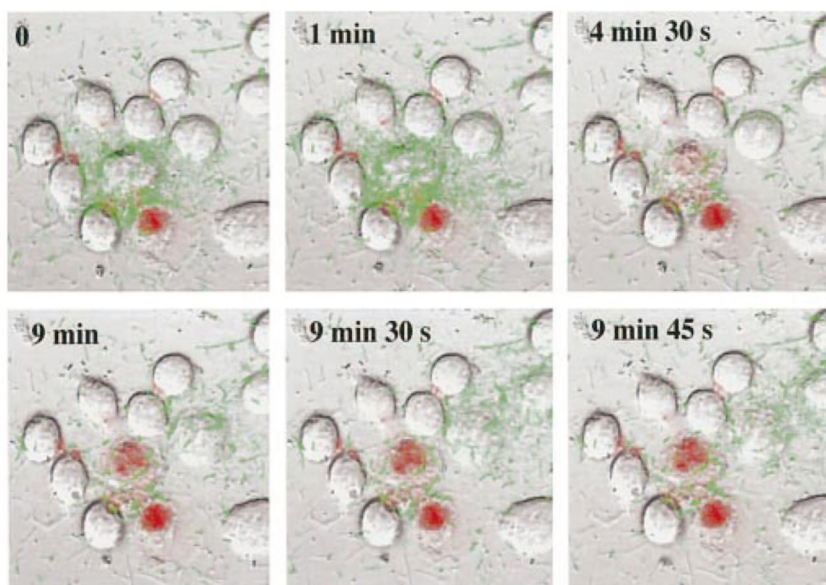
*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative, opportunistic pathogen for humans and is one of the major agents responsible for nosocomial infections. This bacterium causes acute infections in immunocompromised individuals with pathologies such as cancer, AIDS, severe burns and wounds. Chronic respiratory infections resulting from *P. aeruginosa* and associated host inflammatory responses are the major causes of mortality in patients with cystic fibrosis (CF).

In addition to numerous extracellular-secreted virulence determinants, such as elastase, phospholipases and exopolysaccharide alginate (Salyers and Whitt, 1994), the majority of clinical *P. aeruginosa* isolates possess a specialized apparatus, the type III secretion system, dedicated to overcoming the host defences (Frank, 1997). The type III system is widespread in Gram-negative pathogens, including *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*, and in plant pathogens such as *Pseudomonas syringae* and *Erwinia chrysanthemi* (Galan and Collmer, 1999). This unusual system requires close contact between infecting bacteria and the host cell to secrete and deliver toxic bacterial proteins directly to the cytosol of the host cell. The prototypic type III secretion system is that of *Yersinia* species (Cornelis *et al.*, 1998; Cornelis and Van Gijsegem, 2000). The *Yersinia* secretion system contains  $\approx 20$  proteins (*ysc*) that comprise the secretion apparatus spanning the two bacterial membranes. Six proteins (termed Yops) of *Yersinia* spp. are secreted through the *ysc* complex and injected into the eukaryotic cytosol. The translocation of Yop toxins across the eukaryotic membrane is thought to occur through a protein channel consisting of at least two proteins, YopB and YopD, inserted into a membrane by the bacteria (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). Although type III secretions and putative translocation proteins are conserved among bacterial species, the diversity of effectors and their cellular targets results in the different phenotypes induced by pathogens (Galan and Collmer, 1999).

*P. aeruginosa* strains secrete at least four effector proteins through their type III secretion system, namely

Accepted 22 January, 2001. \*For correspondence. E-mail iattreedelic@cea.fr; Tel. (+33) 4 76 88 34 83; Fax (+33) 4 76 88 44 99. †Present address: Département de Bactériologie et Mycologie, Unité BMM, Laboratoire de Yersinia, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.





**Fig. 1.** Pack swarming of *P. aeruginosa* CHA during macrophage infection. J774 cells were infected with CHA (green) expressing GFP (MOI of 10) in medium containing EtBr. EtBr only enters dead cells (red). Infection was performed in Lab-Tek chambers at 37°C for 15–30 min and then taken for microscopy observations. Time-lapse was performed by xyt scan with a Zeiss confocal microscope for 10 min with images saved each 15 s. Image 0 represents the first scan saved.

ExoS, ExoT, ExoY and ExoU. ExoS and ExoT are related proteins with ADP-ribosylation activity (Frank, 1997; Liu *et al.*, 1997) and GTPase-activating activity *in vitro* towards low-molecular-weight GTP-binding proteins (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2000). ExoY is an adenylate cyclase secreted by some strains of *P. aeruginosa* (Yahr *et al.*, 1998). Finally, ExoU (PepA) has been identified by two groups as a putative cytotoxin causing cell death of epithelial cells and macrophages (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998). Results from several laboratories, including our own, strongly suggest that *P. aeruginosa* strains collected from diverse infection environments express different type III secretion-secreted effectors (or effector combinations), and this therefore results in different phenotypes on cultured cells. We recently reported the cytotoxic phenotype of a CF clinical isolate, CHA, on professional phagocytes: neutrophils and macrophages. When infected at a low multiplicity of infection (MOI of 10), such cells die by rapid oncosis characterized by cellular and nuclear swelling. The cytotoxic phenotype required a functional type III secretion system but was independent of the toxin ExoU (Dacheux *et al.*, 1999; 2000), suggesting a novel mechanism of cell intoxication used by some isolates of *P. aeruginosa*.

The work presented here provides new insights into the mechanism of CHA-induced macrophage death. Time-lapse microscopy of infection processes revealed unusual bacterial behaviour during macrophage infection, described as pack swarming. We show that pack swarming is a chemotactic response of bacteria towards molecules released from wounded macrophages, and we provide evidence for a novel, bacterial pore-forming activity that precedes macrophage cell death. This activity requires type III-secreted proteins encoded within the *pcrGVHpopBD* operon.

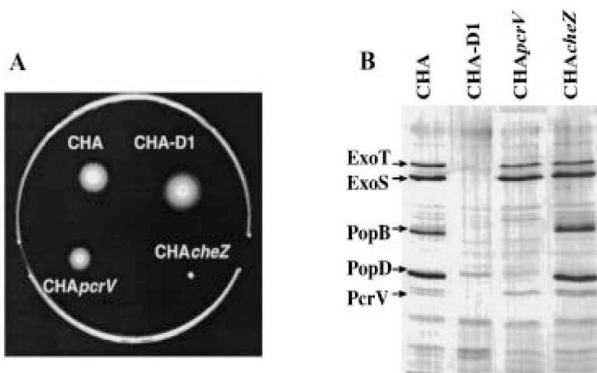
## Results

### *CHA-induced oncosis is accompanied by bacterial pack swarming*

In order to obtain more information concerning the rapid oncosis of J774 macrophages induced via the type III secretion system of the *P. aeruginosa* cytotoxic CF isolate CHA, the infection process was followed using time-lapse confocal microscopy (Fig. 1). The macrophages were grown in Lab-Tek chambers and infected at an MOI of 10 with fluorescent CHA expressing green fluorescent protein (GFP). Incubation was carried out for 15 min at 37°C in medium containing ethidium bromide (EtBr), a membrane-impermeant fluorescent dye that enters only dead cells and colours nuclei red by intercalation within DNA. Although the bacteria were uniformly distributed in the medium, even at 15–30 min after infection, highly motile bacteria have already started to accumulate around some macrophage cells, forming 'pack swarms'. [The term 'pack swarming', used in this work to describe the behaviour of *P. aeruginosa* during macrophage infection, should not be confused with the active surface motility, termed swarming, widespread among Gram-negative bacteria (Harshey, 1994), including *P. aeruginosa* (Kohler *et al.*, 2000).] Swarms were variable in bacterial density, but could reach several hundreds of bacteria (estimated by fluorescence intensity) in some cases. Obvious changes in the morphology of the 'attacked' macrophage were observed during pack swarming. These included membrane blebbing accompanied by cellular and nuclear swelling, cell flattening and detachment from the dish surface, in agreement with the previously reported characterization of CHA-induced cell oncosis (Dacheux *et al.*, 2000).

Several cells surrounded by motile bacteria were followed in independent experiments using time-lapse





**Fig. 2.** Phenotypic characterization of *P. aeruginosa* strains. A. Chemotactic phenotypes of CHA, CHA-D1, CHA<sub>pcrV</sub> and CHA<sub>cheZ</sub> were analysed on 0.3% LB agar plates. The difference in swimming motility between CHA and CHA<sub>pcrV</sub>, visible here, is not significant. B. Secretion of type III system proteins ExoS, ExoT, PcrV, PopB and PopD. Supernatants (40  $\mu$ l) from bacterial-induced cultures (calcium-depleted LB) were analysed by SDS-PAGE. The gel was developed by silver staining.

microscopy. Figure 1 represents selected micrographs of one example of the phenomenon. The whole sequence can be viewed as a time-lapse (QuickTime) movie at <http://www.blackwell-science.com/products/journals/suppmat/mmi/2368/mmi2368sm.htm>.

Approximately 2 min after maximal swarm formation, the selected cell takes up EtBr, suggesting that plasma membrane disintegration has occurred. At about the same time, the bacteria begin to disperse and, in some cases, a new swarm was formed around a neighbouring cell (see Fig. 1). Cell death, measured from the beginning of swarm formation until the incorporation of EtBr into the nuclei of a selected cell, occurs within 5–10 min on average. Pack swarming around cells undergoing the process of oncosis was observed with all motile CF isolates that were previously found to be cytotoxic towards neutrophils and macrophages (data not shown), showing that the phenomenon described is not unique to the CHA strain.

Interestingly, the same phenomenon has been reported for *Salmonella typhimurium* interacting with HeLa cells previously damaged by exposure to low pH (Uhlman and Jones, 1982). It has been postulated that HeLa cells, upon treatment with low pH, release a low molecular chemoattractant in the surrounding medium creating chemotactic gradients, which then attract the bacteria. It has been proposed that the *Salmonella* swarms disperse when the chemoreceptors are saturated, the phenomenon also observed in interactions of CHA with macrophages.

#### Pack swarming is a *P. aeruginosa* chemotactic response

Chemotaxis enables motile bacteria to sense changes in an environment and to respond to the concentration

gradient of nutrients. The tactic response includes chemosensing by methyl-accepting receptor proteins (MCPs), phosphorelay by signal transduction proteins (Che) and locomotion of bacterial flagella (Stock and Surette, 1994). We hypothesized that the *P. aeruginosa* pack swarming around infected J774 cells, by analogy with the phenomenon described for *Salmonella*, could be related to the chemotactic response of bacteria towards molecule(s) released from infected macrophages. To test this hypothesis, we constructed an isogenic non-chemotactic mutant, CHA<sub>cheZ</sub>, in which the *cheZ* gene was inactivated (see *Experimental procedures*). The *cheZ* gene encodes a phosphatase that is necessary for correct signal transduction between membrane MCPs and flagella (Eisenbach, 1996; Boesch *et al.*, 2000). The test for chemotaxis, performed on 0.3% agar plates, confirmed that the insertion of the Gm cassette into *cheZ* on the CHA chromosome resulted in a non-chemotactic phenotype (Fig. 2A). The mutant was still motile in liquid medium. To investigate the pack swarming behaviour of CHA<sub>cheZ</sub>, infection of macrophages with CHA<sub>cheZ</sub> was followed by phase-contrast microscopy in several independent infection experiments. In contrast to the parental CHA strain, the CHA<sub>cheZ</sub> mutant was unable to swarm. Thus, the pack swarming by cytotoxic CHA during macrophage infection required an intact chemotactic signalling pathway.

The secretion of the type III system proteins ExoS, ExoT, PcrV, PopB and PopD *in vitro* under inducing (low calcium level) growth conditions by CHA<sub>cheZ</sub> was compared with secretion by the parental strain CHA. No obvious difference was observed between the two strains (Fig. 2B), showing that the *cheZ* mutation does not affect the type III system secretion. Microscopic observations suggested that the CHA<sub>cheZ</sub> mutant is slightly delayed in provoking cytotoxicity in initial periods of infection (15–30 min after infection), but rapidly reached the wild-type (CHA) level at prolonged incubation periods (not shown). However, the cytotoxicity test, using the release of lactate dehydrogenase (LDH) as a measure of cell death, did not allow measurement of this difference. We have therefore shown here that: (i) the phenomenon of pack swarming is a bacterial chemotactic response towards oncotic macrophages; and (ii) it plays a role in the very initial periods of *ex vivo* CHA–macrophage interactions.

#### Evidence for pore formation by CHA via type III system proteins

As the rapid oncosis of CHA-infected macrophages requires a functional type III secretion system, the pack swarming behaviour of two non-cytotoxic mutants was investigated during infection. The CHA-D1 (Dacheux *et al.*,



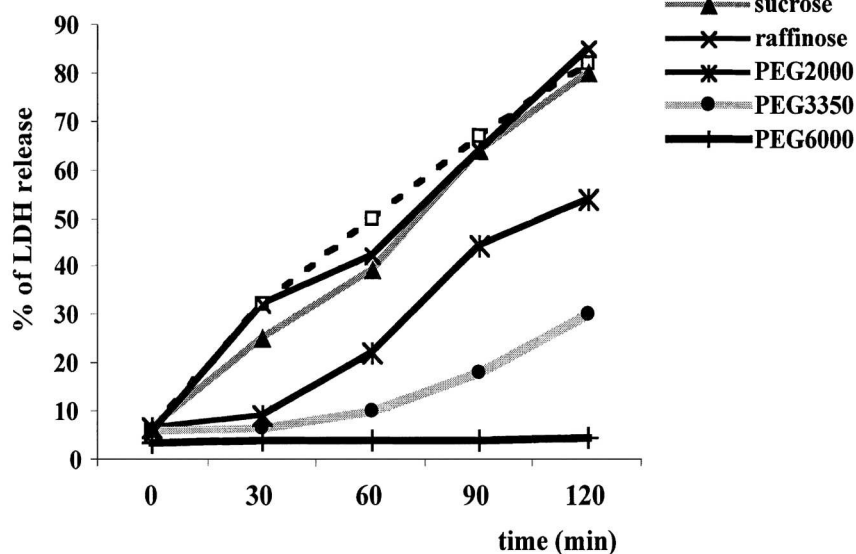
**Table 1.** Pack swarming of *P. aeruginosa* mutant strains during macrophage infections.

Strain observed <sup>a</sup>	Co-incubation with			
	DMEM only	CHA	Streptolysin O	$\alpha$ -toxin
CHA	+	ND	ND	+
CHA-D1	-	+	+	-
CHAprV	-	+	+	-
CHAcHeZ	-	-	ND	ND

a. CHA-D1, CHAprV and CHAcHeZ were labelled with GFP for pack swarming observations in co-infection experiments. Pack swarming, observed in several independent experiments, is symbolized by (+) for presence and (-) for absence. ND, not done.

1999) strain is deficient in type III secretion, because of the disruption of the *exsA* gene encoding the transcriptional activator of the system (Frank, 1997). CHAprV contains a Tn5Tc insertion in the *pcrV* gene within the *pcrGVHpopBD* operon. This mutant has been isolated as non-cytotoxic on neutrophils by a screen of the CHATn5Tc library (D. Dacheux, unpublished). CHAprV is deficient in the secretion of three type III system proteins, PcrV, PopB and PopD, but has an intact type III secretion apparatus, as it secretes at least two type III secreted proteins *in vitro*, ExoT and ExoS (Fig. 2B). CHA-D1 and CHAprV are not cytotoxic towards macrophages over a 2 h period of infection. Although these mutants have intact flagella and are motile on 0.3% agar swimming plates (Fig. 2A), microscopic observation showed that they never pack swarmed during infection of macrophages (Table 1). This suggests that the functionality of the type III secretion system and, more precisely, the presence of three secreted proteins, PcrV, PopB and PopD, is a prerequisite for pack swarming. To test

whether the non-cytotoxic mutants CHA-D1 and CHAprV were able to swarm if an active type III secretion system was provided, macrophages were co-infected with the mutants (MOI of 10) and the parental strain CHA (MOI of 2). To distinguish the strains in co-infection experiments, CHA-D1 and CHAprV were transformed with a plasmid expressing GFP. In co-infection experiments, both mutants were motile and formed swarms around infected macrophages, confirming that the activity of the intact type III secretion system (in strain CHA) provides a chemotactic signal, necessary for pack swarming. We postulated that the chemoattractant molecule is slowly released from infected cells, creating the chemotactic gradient that attracts motile bacteria. Thus, to investigate further the origin of a signal molecule(s), macrophages were independently pretreated with two prototypes of pore-forming bacterial toxins, streptolysin O and staphylococcal  $\alpha$ -toxin (Bhakdi *et al.*, 1996), and then infected with non-cytotoxic mutants, CHA-D1<sup>GFP</sup> and CHAprV<sup>GFP</sup>. The permeability of macrophage membranes resulting from the toxin treatment was verified by the uptake of a membrane-impermeant fluorescent dye Yo-Pro-1 (Molecular Probes). Treatment of cells by both toxins resulted in the rapid uptake of Yo-Pro-1, indicating efficient pore formation. Non-cytotoxic mutants accumulated rapidly around streptolysin O-treated macrophages. In contrast, the treatment of macrophages with  $\alpha$ -toxin resulted in Yo-Pro-1 uptake, but was not sufficient to allow the formation of swarms by non-cytotoxic mutants (Table 1). The difference in action of the two toxins is related to the size of the pores they form in cell membranes;  $\alpha$ -toxin forms small, transmembrane pores of 0.6–1 nm diameter, whereas the pores formed by streptolysin O are up to 30 nm in diameter. As the



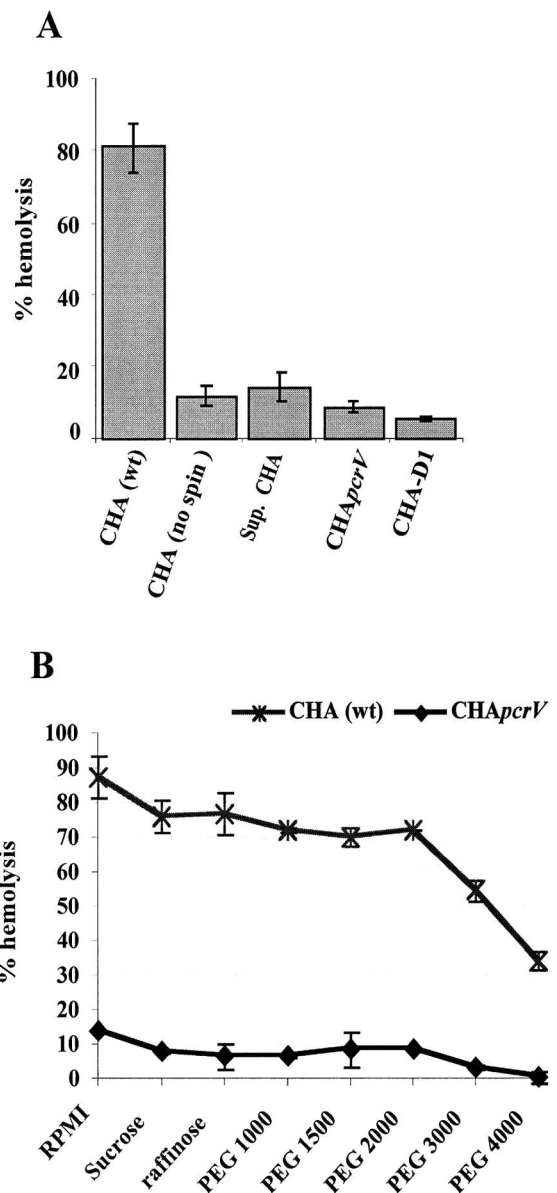
**Fig. 3.** Osmoprotection of CHA-infected macrophages. J774 macrophages grown in 24-well plates were infected with *P. aeruginosa* CHA (MOI of 5) grown to an OD<sub>600</sub> of 1.0–1.5. DMEM was supplemented with 30 mM osmoprotectants, as indicated. Cytotoxicity was followed over a 2 h period by measuring LDH release using a cytotoxicity detection kit (Roche).

cytotoxicity of CHA towards macrophages and the action of streptolysin O are able to provide the same signal required for pack swarming behaviour, it is likely that the type III-secreted proteins have a pore-forming activity resulting in the formation of pores > 1 nm in diameter.

The ability of different sized carbohydrates to protect cells from lysis has been used previously to demonstrate pore formation by the RTX family of cytotoxins and to estimate the size of the pore (Lobo and Welch, 1994). Polyethylene glycols (PEGs) of various molecular weights have also been used to size pores whose formation is induced by pathogens such as *Gardnella vaginalis* (Moran *et al.*, 1992) and *Legionella pneumophila* (Kirby *et al.*, 1998) or, more recently, to determine the size of pores inserted by *Shigella flexneri* type III system-secreted proteins into erythrocyte membranes (Blocker *et al.*, 1999). To determine whether the cytotoxicity of CHA towards macrophages was caused by the formation of a pore inserted into the cell membrane, we performed osmoprotection experiments. Osmoprotectants of different sizes were added to DMEM at a concentration of 30 mM, and LDH release was followed over a 2 h period of infection of macrophages. Although sucrose (0.9 nm diameter) and raffinose (1.3 nm diameter) did not prevent macrophage lysis, PEGs with molecular weights of 2000 (2.8 nm diameter) and 3350 (3.5 nm diameter) showed reproducible delay in LDH release. PEG6000 (5 nm diameter) added to the medium during infection completely inhibited the release of LDH from CHA-infected macrophages (Fig. 3).

#### Characterization of *P. aeruginosa*-induced, contact-dependent haemolysis

To investigate further the pore-forming activity of the type III system-secreted proteins of *P. aeruginosa*, interactions with sheep red blood cells (RBCs) were studied (Fig. 4A). Similar results were obtained with human RBCs (data not shown). Strains were mixed with RBCs in RPMI-1640 at a MOI of 1, incubated for 60 min at 37°C, and haemolytic activity was determined by measuring the release of haemoglobin, as described in *Experimental procedures*. No haemolysis could be detected without prior centrifugation of the bacteria and RBC mixture (Fig. 4A). When bacteria were mixed with RBCs and immediately centrifuged at 1500 g, the CHA strain lysed between 80% and 90% of cells within 60 min. The mutant strains, CHA-D1 and CHA*pcrV*, showed only low (< 20%) haemolytic activity, indicating that a large part of the haemolytic activity induced by CHA is dependent on type III system-secreted proteins. To show that the haemolysis induced by CHA was dependent on cell-to-cell contact, bacterial culture supernatants were also tested for their ability to lyse RBCs. Similar to CHA-D1 and CHA*pcrV*, the



**Fig. 4.** Characterization of *P. aeruginosa*-induced contact-dependent haemolysis. A. Haemolysis of RBCs incubated with CHA, CHA-D1 and CHA*pcrV* at an MOI of 1. Bacterial culture supernatants (CHA sup., 100  $\mu$ l) were added to RBCs, and incubations were performed in parallel with bacterial infections. B. Protection of RBCs from CHA-induced haemolysis by 30 mM osmoprotectants. All experiments were performed at least three times in triplicate. Standard deviation is shown.

bacterial culture supernatants retained only residual (< 20%) haemolytic activity. Macroscopic analysis of CHA and CHA-D1 on sheep blood agar plates showed that the two strains are able to secrete other types of haemolytic factor(s) in the same manner (J. Croize, personal communication). Thus, the residual activity detected in our experiments is probably the result of factor(s) secreted independently of the type III secretion system.

Lysis of RBCs by bacterial pore-forming toxins occurs through osmotic shock (Menestrina *et al.*, 1994a, b) and could be prevented by osmoprotectants present in the



medium at a concentration of 30 mM. To estimate the size of the pore inserted into the membrane of RBCs, haemolysis experiments were performed by incubation with different-sized molecules (Fig. 4B). Although sucrose, raffinose and PEG1000 had no significant effect on the efficacy of haemolysis, PEGs larger than PEG2000 afforded protection against CHA-induced haemolysis. This protection increased with the size of the molecule and reaches  $\approx 60\%$  protection with PEG4000. PEG6000 protected RBCs from haemolysis completely, but this result was not taken into account, as the cells started to fuse in the presence of PEG6000 and were difficult to manipulate (data not shown). Taken together, the osmoprotection of macrophages and RBCs from CHA-provoked lysis with molecules larger than PEG2000 allowed us to estimate the size of the pore incorporated into eukaryotic cell membranes to between 2.8 and 3.5 nm.

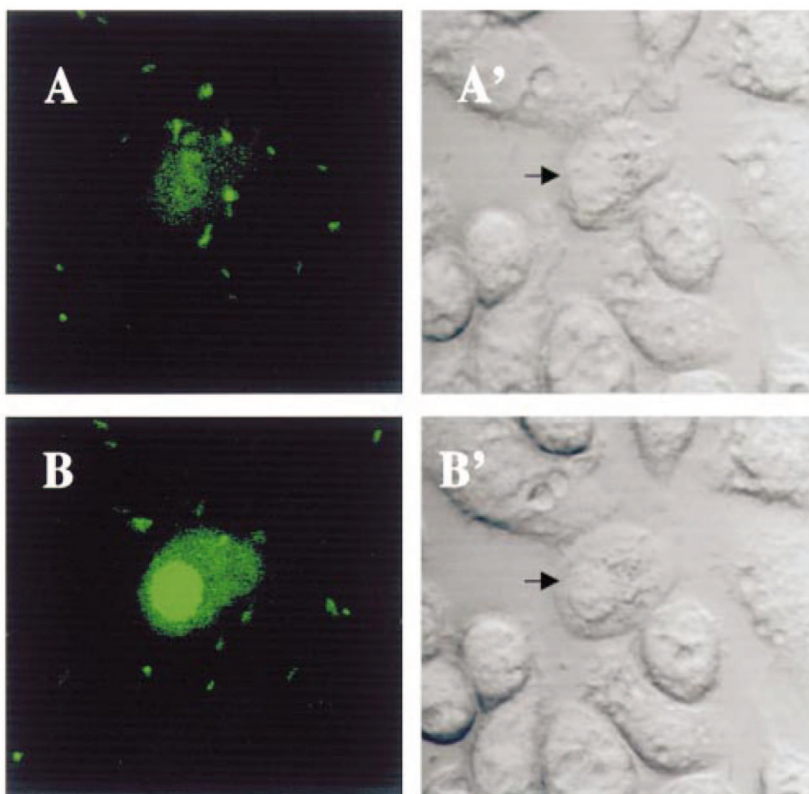
#### *Time-lapse uptake of the vital dye Yo-Pro-1 into CHA-infected macrophages*

The bacterial chemotactic response towards infected macrophages, together with the results of osmoprotection experiments, indicated strongly that *P. aeruginosa* strain CHA inserts pores into macrophage and RBC membranes via type III-secreted proteins. To follow the kinetics of pore formation and macrophage cell death, the uptake of Yo-Pro-1, a membrane-impermeant molecule, into cells was followed at a single-cell level during infection. Yo-Pro-1

was selected because it is a small (630 Da) fluorescent marker with a high affinity for DNA and RNA, enabling uptake to be detected even in the cell cytoplasm. Macrophages were infected with CHA (MOI of 1) in medium containing Yo-Pro-1, incubated for 10 min at 37°C and observed by fluorescence and phase-contrast microscopy simultaneously. One cell around which we could observe the beginning of pack swarm formation was selected for monitoring for change in fluorescence as a function of time. As can be seen on the selected micrographs (Fig. 5), the selected cell started Yo-Pro-1 uptake at a point at which no obvious changes in membrane or cell morphology could be observed (compare images A and A'). The progressive uptake of the dye occurred over  $\approx 8$  min and then reached a plateau. At this time point, the selected cell showed maximal dye uptake and the morphological changes typical of oncosis (Fig. 5, images B and B'). The time course of Yo-Pro-1 uptake, followed by cellular and nuclear swelling characteristic of oncosis, further confirmed the presence of transmembrane pores in CHA-infected macrophages, the activity that precedes macrophage cell death.

#### Discussion

*Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates intoxicate eukaryotic cells through the activity of the type III secretion system. Some strains are able to modify the



**Fig. 5.** Uptake of Yo-Pro-1 into CHA-infected macrophages. Cells were infected with CHA expressing GFP (MOI of 1) in DMEM in the presence of Yo-Pro-1 (1  $\mu$ M). Incubation was performed at 37°C for 5–10 min. When pack swarming was detected, a selected cell was followed for 8 min by observations in time lapse (xyt scan) under a confocal microscope. Images were saved each minute. Selected micrographs A and B correspond to the beginning and end, respectively, of the time lapse. A' and B' are corresponding phase-contrast images. Arrows indicate the selected cell.

cellular actin cytoskeleton by ExoS-exerted GAP activity (Pederson *et al.*, 1999) and ADP-ribosylation activity (McGuffie *et al.*, 1998) directed towards GTP-binding proteins of the Ras and Rho families. ExoT, which is sequence and activity related to ExoS, is required for antiphagocytic activity (Cowell *et al.*, 2000), and ExoY, an adenylate cyclase, changes cAMP levels in eukaryotic cells (Yahr *et al.*, 1998). All these three cytotoxins have been shown to modify cell morphology significantly, with only slight effects on cell viability in *ex vivo* infection models (Vallis *et al.*, 1999). In contrast, the ExoU toxin, which is expressed by some isolates, is responsible for non-apoptotic cell death of macrophages and epithelial cells (Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998; Sawa *et al.*, 1999). In previous studies, we have analysed several CF isolates, including the CHA strain, for their cytotoxicity towards eukaryotic cells, phagocytes and epithelial cells. Epithelial cells, upon infection with CHA, round up and detach from the dish surface without losing their membrane integrity. This phenotype has been associated with the expression of effectors ExoS, T and Y (Vallis *et al.*, 1999). In contrast, in low-multiplicity infections, CHA induces rapid oncotic death of phagocytes that was dependent on a functional type III secretion system, but independent of the ExoU toxin (Dacheux *et al.*, 1999; 2000).

To shed light on the mechanism of macrophage intoxication by CF isolates, we followed the macrophage infection by time-lapse microscopy. This allowed us to observe that macrophage cell death, in an *ex vivo* model, is a stochastic event accompanied by unusual bacterial behaviour. Motile bacteria are directed towards cells and accumulate rapidly around oncotic macrophages, a phenomenon that we have termed pack swarming. By constructing and analysing an isogenic, non-chemotactic mutant, CHA<sub>cheZ</sub>, we showed that the phenomenon of pack swarming is a bacterial chemotactic response towards molecule(s) released by infected macrophages, which, however, does not play an important role in the overall kinetics of CHA-induced cytotoxicity. Non-cytotoxic mutants lacking the type III secretion system proteins were not able to swarm during infection, although they were fully chemotactic on soft agar plates. Indeed, when the activity of the intact type III secretion system was provided by the parental strain in the co-infection experiments, pack swarming of the non-cytotoxic mutants was indistinguishable from that of the parental strain. As the bacterial chemotactic response requires the establishment of concentration gradients of chemoattractant, we postulated that type III secreted proteins are able to form small pores in macrophage membranes. Using two prototypes of pore-forming toxins in infection experiments with non-cytotoxic mutants, we showed that streptolysin O treatment provides the same chemotactic signal as the action of type III secreted proteins PcrV, PopB and PopD (absent in the

mutant CHA<sub>pcrV</sub>). Curiously, treatment of macrophages with  $\alpha$ -toxin, which forms transmembrane pores of about 1 nm, did not provoke a chemotactic response by mutants, suggesting that the chemoattractant(s) released from cells is/are too large to pass through  $\alpha$ -toxin-induced pores.

Treatment of macrophages with streptolysin O, which can form large pores up to 30 nm, resulted in cells that had a flattened appearance resembling 'fried eggs' and detached rapidly from the dish surface. This appearance of dying cells is also characteristic of CHA-infected macrophages (see Fig. 1; Dacheux *et al.*, 2000). Interestingly, the same phenotype was reported with macrophages infected with mutant strains of *Yersinia enterocolitica* that were deficient in all type III secreted effectors, but had an intact 'translocator' composed of YopB and YopD (Neyt and Cornelis, 1999). The authors suggested that YopB and YopD in mutated *Yersinia* insert into the macrophage membranes and form pores, leading to cell flattening. In contrast to the wild-type *P. aeruginosa* strains, the wild-type *Yersinia* strain does not provoke oncosis but, rather, rounding up of macrophages as a result of the action of the cytotoxic effectors YopH and/or YopE (Rosqvist *et al.*, 1995; Cornelis *et al.*, 1998). It was suggested by the authors that 'translocator' pores are filled by secreted Yops that are passing into the cell cytosol, thus preventing cell flattening (Hakansson *et al.*, 1996; Neyt and Cornelis, 1999). Indeed, YopB and YopD are able to interact with artificial liposomes to form protein channels (Tardy *et al.*, 1999), and YopB was also shown to be haemolytic and to have a membrane-disrupting activity on artificial lipid bilayers (Hakansson *et al.*, 1996).

The osmoprotection experiment, together with time course of Yo-Pro-1 uptake, confirmed that the CHA-induced oncosis of macrophages is preceded by pore formation, an activity that requires the secretion of PcrV, PopB and PopD. The fact that YopB/D are able to insert into eukaryotic membranes suggests that it is possible that PopB alone, or together with PopD and/or PcrV, could be inserted into macrophage membranes and, by forming small pores, allows leakage of the cytoplasm, which later results in cell lysis. Indeed, PopB of *P. aeruginosa*, expressed in a *Yersinia* host, was able to induce RBC lysis as a result of a 2- to 3-nm-sized pore (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998). Based on osmoprotection experiments, the size of the pore inserted into macrophage and RBC membranes by *P. aeruginosa* CHA (estimated to be 2.8–3.5 nm) is similar to that of YopB-dependent pores (1.2–3.5 nm) (Hakansson *et al.*, 1996). Using dye exclusion experiments, Neyt and Cornelis (1999) estimated the size of YopB/D pores to be 1.6–2.3 nm. Taking into account these similarities, we propose that the *P. aeruginosa* 'translocator' pore is not sufficiently filled with Exo effectors, and that it may have, specifically when interacting with macrophages, the role



**Table 2.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		Gibco BRL
<i>P. aeruginosa</i>		
CHA	Mucoid CF isolate	Toussaint <i>et al.</i> (1993)
CHA-D1	CHA <i>exsA</i> ::Gm	Dacheux <i>et al.</i> (1999)
CHACHEZ	CHA <i>cheZ</i> ::Gm	This work
CHAprV	Tn5Tc insertion in <i>pcrV</i>	D. Dacheux (unpublished)
<b>Plasmids</b>		
pUCGm	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Schweizer (1993)
pUCP20	Ap <sup>r</sup>	Schweizer (1991)
pEX100T	Ap <sup>r</sup>	Schweizer and Hoang (1995)
pUCP20- <i>gfpmut3</i>	Ap <sup>r</sup>	This work

Ap<sup>r</sup>: ampicillin resistance, Gm<sup>r</sup>: gentamicin resistance.

of a pore-forming toxin, the activity of which leads to rapid cell oncosis.

Several other bacterial pathogens express proteins that share the same organization of functional domains with PopB/D and YopB/D. These include EspD of enteropathogenic *Escherichia coli*, IpaB of *Shigella* and SipB of *Salmonella*. It has been shown recently that the induction of necrosis in neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion and 'translocators' IpaB and IpaC (Francois *et al.*, 2000), putative functional homologues of PopB/D. Almost nothing is known about the action and localization of PcrV and PopB/D in *P. aeruginosa*. Whether and how these proteins insert into eukaryotic cell membranes to act as effector 'translocators' and the mechanism of pore formation are the challenge of our ongoing studies.

## Experimental procedures

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The strains used in this study are listed in Table 2. *Pseudomonas aeruginosa* CHA, referred to here as the wild type, is a mucoid CF isolate. All mutants used in this study were isogenic of the CHA strain. CHA-D1 has the *exsA* gene inactivated by the insertion of the gentamicin (Gm) resistance cassette. CHAprV contains the transposon Tn5Tc insertion in the *pcrV* gene (D. Dacheux, unpublished). To obtain the CHACHEZ mutant, part of the *cheYZ* operon was isolated from CHA by polymerase chain reaction (PCR) amplification. Sense (5'-GCCTCGACCGCAGCTTGTAAC) and antisense (5'-GTCCTGGTAATCCTGCGCC) primers were synthesized according to the sequence obtained from the *Pseudomonas* genome project database (<http://www.pseudomonas.com>). The PCR product of 1.025 kb was cloned in pEX100T (Schweizer and Hoang, 1995) and inactivated by the insertion of the Gm cassette from pUCGm (Schweizer, 1993) into the single *EcoRI* site, located 35 nucleotides downstream from the *cheZ* translation start codon. The resulting plasmid was transferred to CHA by triparental conjugation, using pRK2013 as helper plasmid (Schweizer and Hoang, 1995). The correct double recombination event at the *cheZ* locus was verified by

Southern blot and PCR analysis. *P. aeruginosa* strains were grown on *Pseudomonas* isolation agar (Difco) plates or in liquid Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with agitation. The antibiotics used were carbenicillin (300  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), tetracycline (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and gentamicin (200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). For time-lapse microscopy experiments, *P. aeruginosa* strains were rendered fluorescent using plasmids expressing GFP. The promoterless *gfpmut3* (Cormack *et al.*, 1996) was cloned as a *XbaI*-*PstI* fragment into pUCP20 (Schweizer, 1991). The resulting plasmid, pUCP20-*gfpmut3*, was introduced into bacteria by electroporation (Enderle and Farwell, 1998).

### Cell culture and infection conditions

The macrophage cell line J774 (ATCC) was grown in DMEM (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco). The cells were seeded in 24-well culture plates at  $3 \times 10^5$  cells well<sup>-1</sup> 20 h before infection. The bacterial strains were grown over night in LB, diluted to an optical density of 0.1 at 600 nm (OD<sub>600</sub>) and grown further for  $\approx 3$  h to an OD<sub>600</sub> of between 1.0 and 1.5. Macrophages were infected with bacteria resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of DMEM-10% FCS to give an MOI of 1-10, as indicated. Incubation was performed in 300  $\mu\text{l}$  of DMEM-10%FCS in a CO<sub>2</sub> (5%) incubator at 37°C. In osmoprotection experiments, infections were performed in 30 mM solutions of sucrose, raffinose, PEG2000, PEG3350 or PEG6000 made up in DMEM-10%FCS and filter sterilized. Cytotoxicity was assessed by determination of LDH release into infected supernatants using a cytotoxicity detection kit (Roche) as described previously (Dacheux *et al.*, 2000).

### Phenotypic characterization

*P. aeruginosa* strains used in this study were characterized for their ability to secrete type III system proteins *in vitro*. Strains were grown in LB supplemented with appropriate antibiotics for 16 h at 37°C with agitation. Cultures were then diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in calcium-depleted medium (induction condition) containing 5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub> and grown for 4 h. After centrifugation, 40  $\mu\text{l}$  of culture supernatants was analysed directly by 0.1% SDS-12%

PAGE. Motility was assessed by phase-contrast microscopy of bacteria grown in liquid LB to an OD<sub>600</sub> of 1–2. Swimming and chemotaxis were tested on motility plates in several independent experiments. Freshly grown cells were transferred by a sterile toothpick to a 0.3% agar LB plate and incubated at room temperature for 8 h.

#### Observation of pack swarming

Macrophages were infected with bacteria at an MOI of 1–10, incubated for 15 min in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and taken for observation. Bacterial pack swarming and changes in macrophage morphology during infection were followed by observation under a Zeiss inverted microscope (objective 32×) in more than five independent experiments. Streptolysin O (Sigma) was diluted in sterile PBS to 50 U μl<sup>-1</sup> and aliquoted. Before use, it was treated with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 5 min at room temperature. Between 2 and 10 U μl<sup>-1</sup> was added to infected medium. Staphylococcal α-toxin (Sigma) was added to macrophages at 25–50 U μl<sup>-1</sup>. The permeabilization of macrophages by toxins was checked using Yo-Pro-1 dye (Molecular Probes) at 1 μM.

#### Time-lapse in vivo microscopy

The CHA strain, expressing GFP, was used to infect J774 macrophages in Lab-Tek I chambers (Nunc). Infection was carried out for 5–10 min at 37°C, and the chambers were then taken for observation. When indicated, the infected medium was supplemented with 500 ng ml<sup>-1</sup> EtBr or 1 μM Yo-Pro-1 dye. Infection was followed using an inverted Zeiss (LSM 410) confocal microscope (in xyt scan) interfaced with a mixed-gas helium–argon laser. Phase-contrast and fluorescent images were collected simultaneously every 15 s and processed using ADOBE PHOTOSHOP 5.0 software.

#### Haemolysis assay

Haemolysis was performed essentially as described by Blocker *et al.* (1999). Sheep RBCs, obtained from BioMérieux (France), were washed three times in PBS, pH 7.4 (150 mM NaCl), and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) at 5 × 10<sup>8</sup> RBCs ml<sup>-1</sup> at 4°C. Bacteria were grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 1.0–1.5, centrifuged and resuspended in RPMI-1640 at 5 × 10<sup>8</sup> bacteria ml<sup>-1</sup>. Haemolysis assays were started by mixing 100 μl of RBCs and 100 μl of bacteria in round-bottomed, 96-well plates, which were then centrifuged at 1500 g for 10 min and incubated at 37°C for 1 h. The release of haemoglobin was measured at 540 nm, after centrifugation, in 100 μl of cell supernatants. The percentage (%) of total lysis was calculated as follows: % = [(X–B)/(T–B)] × 100. B (baseline) was a negative control, corresponding to RBCs incubated with 100 μl of RPMI-1640, and T was a positive control, corresponding to total lysis obtained by incubating the cells with 0.1% SDS. X is the OD value of the analysed sample. When indicated, RBCs were resuspended in 60 mM sterile solutions of osmoprotectants, made up in RPMI-1640, giving a final concentration of molecules to 30 mM. All experiments were performed at least three times in triplicate.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant 98033 from the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM) and by a grant from DGA (DSP/STTC). We thank A. Blocker for critical reading of the manuscript and advise on the osmoprotection experiments, B. Toussaint and M. Satre for constant support and helpful suggestions. Thanks are due to A. de Groot, A. Colbeau and W. Dischert for helpful discussions.

#### Supplementary material

The following material is available from <http://www.blackwell-science.com/products/journals/suppmat/mmi/2368/mmi2368sm.htm>

Time-lapse movie showing J774 macrophages surrounded by motile *Pseudomonas aeruginosa*.

#### References

- Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M., and Palmer, M. (1996) *Staphylococcal* alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* **165**: 73–79.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**: 683–693.
- Boesch, K.C., Silversmith, R.E., and Bourret, R.B. (2000) Isolation and characterization of nonchemotactic CheZ mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 3544–3552.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33–38.
- Cornelis, G.R., and Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735–774.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., *et al.* (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315–1352.
- Cowell, B.A., Chen, D.Y., Frank, D.W., Vallis, A.J., and Fleiszig, S.M. (2000) ExoT of cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* prevents uptake by corneal epithelial cells. *Infect Immun* **68**: 403–406.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 6164–6167.
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**: 2916–2924.
- Eisenbach, M. (1996) Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **20**: 903–910.
- Enderle, P.J., and Farwell, M.A. (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells [published erratum appears in *Biotechniques* 1999 April; 26(4): 716]. *Biotechniques* **25** (954–956): 958.

- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., *et al.* (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* **25**: 547–557.
- Francois, M., Le Cabec, V., Dupont, M.A., Sansonetti, P.J., and Maridonneau-Parini, I. (2000) Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* **68**: 1289–1296.
- Frank, D.W. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**: 621–629.
- Fritzh-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1998) Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**: 1155–1165.
- Galan, J.E., and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322–1328.
- Goehring, U.M., Schmidt, G., Pederson, K.J., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**: 36369–36372.
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F., and Wolf-Watz, H. (1996) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* **15**: 5812–5823.
- Harshey, R.M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389–394.
- Hauser, A.R., Kang, P.J., and Engel, J.N. (1998) PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* **27**: 807–818.
- Kirby, J.E., Vogel, J.P., Andrews, H.L., and Isberg, R.R. (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**: 323–336.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990–5996.
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun* **68**: 6066–6068.
- Liu, S., Yahr, T.L., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1997) Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 1609–1613.
- Lobo, A.L., and Welch, R.A. (1994) Identification and assay of RTX family of cytolysins. *Methods Enzymol* **235**: 667–678.
- McGuffie, E.M., Frank, D.W., Vincent, T.S., and Olson, J.C. (1998) Modification of Ras in eukaryotic cells by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **66**: 2607–2613.
- Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S., and Welch, R. (1994a) Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* **87**: 249–267.
- Menestrina, G., Schiavo, G., and Montecucco, C. (1994b) Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Mol Aspects Med* **15**: 79–193.
- Moran, O., Zegarra-Moran, O., Virginio, C., Gusmani, L., and Rottini, G.D. (1992) Physical characterization of the pore forming cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *FEMS Microbiol Immunol* **5**: 63–69.
- Neyt, C., and Cornelis, G.R. (1999) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **33**: 971–981.
- Pederson, K.J., Vallis, A.J., Aktories, K., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1999) The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol* **32**: 393–401.
- Rosqvist, R., Persson, C., Hakansson, S., Nordfeldt, R., and Wolf-Watz, H. (1995) Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 230–234.
- Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (1994) *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P., and Frank, D.W. (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature Med* **5**: 392–398.
- Schweizer, H.D. (1993) Small broad-host-range gentamicin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechniques* **15**: 831–834.
- Schweizer, H.P. (1991) *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* **97**: 109–121.
- Schweizer, H.P., and Hoang, T.T. (1995) An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **158**: 15–22.
- Stock, J., and Surette, M. (1994) Bacterial chemotaxis. The motor connection. *Curr Biol* **4**: 143–144.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M., and Cabiaux, V. (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J* **18**: 6793–6799.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416–421.
- Uhlman, D.L., and Jones, G.W. (1982) Chemotaxis as a factor in interactions between HeLa cells and *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* **128**: 415–418.
- Vallis, A.J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1999) Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* **67**: 2040–2044.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13899–13904.

## ANNEXE 2

Article 2: Goure J., Pastor A., Faudry E., Chabert J., Dessen A. et Attree I. (2004).

The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/D translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.*, **72**(8), 4741-4750.





## The V Antigen of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Assembly of the Functional PopB/PopD Translocation Pore in Host Cell Membranes

Julien Goure,<sup>1</sup> Alexandrine Pastor,<sup>1</sup> Eric Faudry,<sup>1</sup> Jacqueline Chabert,<sup>1</sup>  
Andréa Dessen,<sup>2</sup> and Ina Attree<sup>1\*</sup>

*Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (UMR 5092 CNRS/CEA/UJF), DRDC, CEA,<sup>1</sup> and  
Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (LCM), Institut de Biologie  
Structurale Jean-Pierre Ebel,<sup>2</sup> Grenoble, France*

Received 14 January 2004/Returned for modification 19 February 2004/Accepted 27 April 2004

***Pseudomonas aeruginosa* efficiently intoxicates eukaryotic cells through the activity of the type III secretion-translocation system (TTSS). Gene deletions within the translocation operon *pcrGVH-popBD* abolish pore-forming activity of *P. aeruginosa* strains with macrophages and TTSS-dependent hemolysis. Here we investigated the requirements for PcrV, PopB, and PopD in pore formation by analyzing specific mutants using red blood cells (RBCs) and fibroblasts expressing green fluorescent protein fused to actin. Simultaneous secretion of three proteins, PopB, PopD, and PcrV, was required to achieve wild-type hemolysis and effector translocation. Deletion of *pcrV* in a cytotoxic strain did not affect secretion of PopB and PopD but abolished hemolytic activity and translocation of effectors into fibroblasts. Notably, the PcrV-deficient mutant was not capable of inserting PopD into host cell membranes, whereas PopB and PopD, but not PcrV, were readily found within membranes of wild-type-infected RBCs. Immunoprecipitation experiments performed by using a liposome model of pore assembly revealed a direct interaction between PopD and PopB but not between PopD and PcrV. Consequently, PcrV is necessary for the functional assembly of the PopB/D translocon complex but does not interact directly with pore-forming Pop proteins.**

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous gram-negative opportunistic pathogen which frequently causes nosocomial infections. Patients with severe immunosuppression or underlying disease, such as cystic fibrosis and severe burn patients, are especially at risk of colonization and infection by *P. aeruginosa*. In a cystic fibrosis patient's lung, infection and the associated inflammatory reactions due to this bacterium are considered to be a predictor of morbidity and mortality. Once the infection has been established, eradication is difficult despite prolonged antibiotic therapy (36, 57).

*P. aeruginosa*, like other gram-negative plant and animal pathogens, utilizes a type III secretion-translocation system (TTSS) to intoxicate eukaryotic cells. This system allows the extracellularly located bacterium to inject its toxic products (effectors) directly into the host cell cytoplasm (13, 24). The secretion and translocation steps involve more than 20 proteins assembled into a needle-like structure called an injectisome (5, 12). Four exoenzymes (ExoS, ExoT, ExoY, and ExoU), which are secreted and translocated through the *P. aeruginosa* injectisome, paralyze normal cellular functions (20, 29, 60), thus enabling successful establishment of infection. All clinical isolates of *P. aeruginosa* possess the TTSS locus encompassing five operons coregulated by the central transcriptional activator ExsA (15, 20). Recent studies have shown that operons of the locus are expressed in 25 to 80% of strains, depending on the site of infection from which the strain collection comes (3, 15, 18, 28, 43). The phenotypes associated with TTSS-secreted

proteins on cultured cells depend both on the eukaryotic cell type and on the combination of secreted effectors (11, 19, 30, 55).

Components involved in effector translocation across the host plasma membrane are encoded in the *pcrGVH-popBD* operon (Fig. 1A). PopB is a 391-amino-acid protein with two predicted  $\alpha$ -helical transmembrane domains (amino acids 171 to 191 and 235 to 259) and two coiled-coil domains (amino acids 107 to 174 and 331 to 375). PopD is a 296-amino-acid protein possessing one predicted central transmembrane domain (amino acids 116 to 137) and, in addition, a C-terminal domain with the potential to form an amphipathic  $\alpha$ -helix (amino acids 267 to 281) (Fig. 1B) (9, 47). When provided *in trans*, encoded by the *pcrGVH-popBD*-containing fragment, these products are able to complement *Yersinia pseudotuberculosis yopB* or *yopD* mutants deficient in delivery of the YopE effector to the host cell (23). When the homologous proteins of *Yersinia* spp., YopB and YopD, are expressed by *Yersinia*, they are able to associate with liposomes (53). Moreover, recent work has shown that *in vitro* oligomerization of recombinant PopB and PopD promotes binding to and disruption of artificial membranes by formation of ringlike structures (47). It has been proposed that those proteins participate in the formation of a translocation pore which allows active passage of toxins across the eukaryotic cell membrane (26, 41, 47).

PcrH is an 18.5-kDa acidic protein that binds to PopB and PopD (1, 47) and acts, *in vivo*, as a customized chaperone necessary for stabilization of Pop proteins (7). A third secreted protein of the operon is PcrV, also called the V antigen. Antibodies directed against PcrV protect cultured cells and model animals against *P. aeruginosa* infection, thus making PcrV a

\* Corresponding author. Mailing address: DRDC/BBSI, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France. Phone: 33 438783483. Fax: 33 438784499. E-mail: iatreedelic@cea.fr.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Source or reference(s)
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i>		
CHA	Mucoid, cytotoxic cystic fibrosis isolate	14, 54
CHA $\Delta$ BD	CHA with the gentamicin cassette inserted within <i>popB</i> and <i>popD</i>	This study
CHA $\Delta$ V	CHA with an internal deletion of the <i>perV</i> gene	This study
<b>Plasmids</b>		
pIA60	7-kb EcoRI fragment from CHA with <i>pcrGVH-popBD</i> and <i>exsCBA</i> in pUC18	This study
pIA101*	Ap <sup>r</sup> -pUCP20- <i>gfpmut3</i> with deletion of the <i>plac</i> -10 region	15
pUCGm	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	48
pPCR-Script	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	Stratagene
pUC18	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	New England Biolabs
pEX100T	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	49
pRK2013	Km <sup>r</sup> , ColE1 <i>mob</i> <sup>+</sup> <i>tra</i> <sup>+</sup> (RK2) helper plasmid	34
pIApG	Fusion between the <i>pcrGVH-popBD</i> promoter ( <i>pG</i> ) and <i>gfpmut3</i>	This study
pJG1	Ap <sup>r</sup> , 426-bp EcoRI/BamHI PCR fragment of <i>popB</i> in pUC18	This study
pJG2	Ap <sup>r</sup> , 526-bp BamHI/HindIII PCR fragment of <i>popD</i> in pUC18	This study
pJG3	Ap <sup>r</sup> , BamHI/HindIII fragment from pJG2 cloned into pJG1	This study
pJG4	SmaI fragment (gentamicin) from pUCGm cloned into BamHI site in pJG3	This study
pJG5	EcoRI/HindIII fragment from pJG4 cloned into SmaI site in pEX100T	This study
pJG6	<i>popB</i> cloned downstream of <i>pG</i> promoter into pIApG	This study
pJG7	<i>popD</i> cloned downstream of <i>pG</i> promoter into pIApG	This study
pJG8	<i>popBD</i> cloned downstream of <i>pG</i> promoter into pIApG	This study
pJG9	Ap <sup>r</sup> , 1,615-bp SmaI PCR fragment containing <i>perV</i> in pEX100T	This study
pJG10	Deletion of codons 17 to 171 of <i>perV</i> by digestion with SacI-SalI in pJG9	This study
pJG11	<i>perV</i> cloned downstream of <i>pG</i> promoter into pIApG	This study

key component of the TTSS and a potential therapeutic target (21, 45, 50). PcrV is necessary for ExoU-dependent cytotoxicity (45) and translocation of ExoS into epithelial cells (52). However, the exact role played by PcrV in the translocation process is still obscure.

In this work we further characterized the requirement for secreted products encoded by the *pcrGVH-popBD* operon for the pore-forming activity of the *P. aeruginosa* TTSS by constructing specific nonpolar mutants and analyzing them in two cellular infection models. We found that each of three proteins, PcrV, PopB, and PopD, is absolutely required for pore formation and cytotoxicity. Fractionation experiments with infected red blood cells (RBCs) showed that only PopB and PopD form the membrane-associated core of the pore. We demonstrated that PcrV is required for anchoring of PopD into RBC membranes. In addition, immunoprecipitation experi-

ments revealed that there is a direct interaction between PopD and PopB. Consequently, in vivo, PcrV is necessary for functional assembly of a membrane-inserted PopB/PopD complex.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** All *P. aeruginosa* strains used in this study (Table 1) were derived from the cytotoxic cystic fibrosis isolate CHA (14, 54), which is referred to below as the wild-type strain. Bacteria were grown either on *Pseudomonas* isolation agar (Difco) plates or in liquid Luria broth (LB) at 37°C with agitation. The antibiotics used for selection were carbenicillin (300  $\mu$ g/ml) and gentamicin (200  $\mu$ g/ml). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) was used for standard cloning experiments.

**Construction of CHA $\Delta$ BD and CHA $\Delta$ V mutants.** All plasmids and primers used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. The CHA $\Delta$ BD mutant

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Primer	DNA sequence <sup>a</sup>
OG1	5'-TCGGATCCGATGATGTTGCGTCCGGC
OG2	5'-TCGGATCCGCAGGGTGTCTTCCGG
5' <i>popD</i> -HindIII	5'-GTCGTAGGGGAAGCTTGCAGAA
3' <i>popD</i> -BamHI	5'-GAGTCTGCGGGATCCCGGAGT
5' <i>popB</i> -EcoRI	5'-TCCGGAATTCAGGCACTGTGCA
3' <i>popB</i> -BamHI	5'-CCACTCCGGGGATCCCGCAGACT
5' <i>popB</i> -XbaI	5'-CTAGTCTAGATAACCGCGAGAAAGGATC
3' <i>popB</i> -HindIII	5'-TACCCAAGCTTACGTCTCCTCAGATCGC
5' <i>popD</i> -XbaI	5'-GCTAGTCTAGAGATCTGAGGAGACGTCAC
3' <i>popD</i> -HindIII	5'-TACCCAAGCTTAGACGGCTCAGACCACT
5' <i>perV</i> -XbaI	5'-CTAGTCTAGAGTGGCTTGTGATCTGAGG AATC
3' <i>perV</i> -HindIII	5'-TACCCAAGCTTCTTTAGATCGCGCTGAGA ATGTCG
5'SmaI- <i>pcrG</i>	5'-TGACCCGGGATGGGCGACATGAACGAAT ACAC
3'SmaI-2	5'-TACCCGGGCCGAGTAGAAGC

<sup>a</sup> Restriction sites incorporated into primers are underlined.

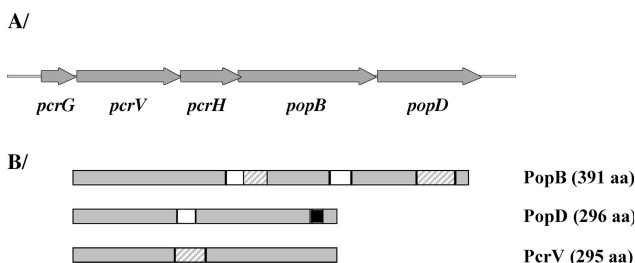


FIG. 1. Genetic organization and structural features of the *P. aeruginosa* type III translocon. (A) Genetic organization of the *pcrGVH-popBD* operon. (B) Predicted transmembrane domains (open boxes), coil-coiled domains (cross-hatched boxes), and amphipathic  $\alpha$ -helix (solid box) of secreted proteins from the operon (PopB, PopD, and PcrV). aa, amino acids.

was created by using the following strategy. The 5' flanking region of *popB* and the 3' flanking region of *popD* were amplified in two separate PCRs by using pIA60 as the template. The oligonucleotides used to amplify the 5' flanking region of *popB* were 5'*popB*-EcoRI and 3'*popB*-BamHI. PCR amplification generated a unique 426-bp product that was cloned in pUC18 to give pJG1. Amplification of the 3' flanking region of *popD* was achieved with 5'*popD*-HindIII and 3'*popD*-BamHI, which generated a 526-bp fragment that was cloned in pUC18, generating pJG2. The two PCR products were ligated together in pUC18, giving plasmid pJG3. Next, an 855-bp SmaI fragment containing the gentamicin resistance cassette from pUCGm was ligated into the blunt-ended BamHI site of pJG3, giving pJG4. To carry out gene replacement on the *P. aeruginosa* chromosome, the EcoRI-HindIII insert from pJG4 was blunt ended with the Klenow enzyme and subcloned into pEX100T. The resulting suicide plasmid, pJG5, was then transferred to *P. aeruginosa* CHA by triparental mating by using pRK2013 as a helper plasmid, as described previously (34). Double recombinants were isolated by a negative selection strategy by using *Pseudomonas* isolation agar plates containing 5% sucrose as described previously (49). The correct double recombination event at the *popBD* locus was verified by Southern blotting.

The *pcrV* gene in the parental CHA strain was inactivated by using the following strategy. A PCR-amplified fragment containing the *pcrV* gene with 308 bp of upstream DNA and 410 bp of downstream DNA was generated by using primers 5'SmaI-*pcrG* and 3'SmaI-2. The amplified 1,615-bp PCR fragment was cloned as an SmaI-SmaI insert into pEX100T, yielding pJG9. A deletion of codons 17 to 171 was then generated by digestion of pJG9 with SacI-Sall and blunt ending with the Klenow enzyme, and this was followed by religation. The resulting suicide plasmid, pJG10, was then transferred to *P. aeruginosa* CHA, as described above. Clones with pJG10 integrated into *pcrV* by a single recombination event were selected by using *Pseudomonas* isolation agar plates containing carbenicillin. Selection for a second recombination event was performed by growing cointegrate strains on plates containing 5% sucrose. Carbenicillin-sensitive, sucrose-resistant strains were tested for correct replacement of the wild-type allele by the *pcrV*-deleted allele by Western and Southern blotting. Several independently constructed mutants were tested in preliminary experiments and had the same phenotype.

**Construction of complementing plasmids.** pIApG was constructed by placing the PCR-amplified promoter region of *pcrGVH-popBD* upstream of *gfpmut3* in pIA101\*, as described previously (15), by using the OG1 and OG2 oligonucleotides (Table 2). All genes were amplified from pIA60 by using Vent polymerase (BioLabs) and oligonucleotides listed in Table 2. Unique restriction sites were introduced and used to clone each amplified fragment into the appropriate vector's multiple cloning sites. All complementing plasmids were constructed in pIApG after removal of the *gfp* gene, which placed the gene of interest under transcriptional control of a native promoter of the *pcrGVH-popBD* operon (*pG*). All cloning was performed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Complementing plasmids were introduced into *P. aeruginosa* strains by transformation (10).

**Production and purification of antibodies.** Recombinant proteins PcrV, PopB, and PopD containing His<sub>6</sub> tags were overproduced in *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen). Details of plasmid construction, the induction conditions, and the purification procedures have been previously described (47). Antibodies were raised in rabbits for purified His<sub>6</sub>-PcrV and gel-excised His<sub>6</sub>-PopB and His<sub>6</sub>-PopD antigens by Eurogentec as described by the manufacturer. Specific anti-PcrV and anti-PopB antibodies were affinity purified from the serum by using a preactivated CH Sepharose 4B gel (Amersham Pharmacia) coupled with recombinant purified His<sub>6</sub>-PcrV or His<sub>6</sub>-PopB, as described in the manufacturer's protocol.

**Immunoblot analysis.** Overnight cultures of *Pseudomonas* strains grown at 37°C in LB supplemented with appropriate antibiotics were diluted to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.2 in LB or calcium-depleted LB (induction conditions) containing 5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub> and then grown at 37°C until the OD<sub>600</sub> reached 0.8. After the OD<sub>600</sub> was measured, the cells were harvested, and the culture supernatant was collected. The proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membranes with 1× Laemmli buffer containing 20% ethanol. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk before addition of polyclonal primary antibodies and a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma). Detection was performed with an ECL kit (Amersham Pharmacia). The detection limit with each antibody was evaluated by using purified recombinant PcrV, PopB, and PopD. The antibodies used were affinity-purified anti-PcrV (1:3,000) and anti-PopB (1:5,000) and total polyclonal sera raised against PopD (1:1,000) and ExoS (1:1,000) (kindly provided by A. Forsberg [22]).

**Cell culture and infections.** NIH 3T3 fibroblasts expressing enhanced green fluorescent protein (GFP)- $\beta$ -actin (3T3/GFA) were a gift from R. Scaife (46). The cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco) supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum (Gibco). The cells were seeded in four-well Lab-Tek I chambers (Nunc) 24 h before infection. Bacterial strains were grown overnight in LB, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1, and grown for an additional 3 h to an OD<sub>600</sub> of approximately 1.2. 3T3/GFA cells were infected with bacteria in Dulbecco modified Eagle medium at a multiplicity of infection (MOI) of 10. Modifications in cell morphology and GFP-actin distribution were monitored by using a Leica inverted microscope (DM IRE 2). The images were collected by using a DC 350F digital camera and were treated with QFluo Pro software.

**Hemolysis assay.** Sheep RBCs, obtained from BioMérieux, were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS; 150 mM NaCl; pH 7.4) and resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) at a concentration of  $5 \times 10^8$  RBCs ml<sup>-1</sup> at 4°C. Bacteria were grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 1.2, centrifuged, and resuspended in RPMI 1640 medium at a concentration of  $5 \times 10^8$  bacteria ml<sup>-1</sup>. Hemolysis assays were initiated by mixing 100  $\mu$ l of RBCs and 100  $\mu$ l of bacteria in round-bottom 96-well plates, which were then centrifuged at 2,000  $\times$  g for 10 min and incubated at 37°C for 1 h. The release of hemoglobin was measured, and the percentage of hemolysis was calculated as described previously (4).

**RBC membrane isolation.** RBC membrane isolation was performed essentially as described previously (4), with some modifications. Bacteria and sheep RBCs were resuspended in Tris-saline (30 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7.5) at concentrations of  $5 \times 10^{10}$  and  $1 \times 10^{10}$  cells ml<sup>-1</sup>, respectively. Hemolytic reaction mixtures were prepared in 50-ml conical tubes with  $2 \times 10^9$  (each) bacteria and RBCs and a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche). Samples were centrifuged at 2,000  $\times$  g at 4°C for 10 min and incubated at 37°C for 1 h. Hemolysis was assessed spectrophotometrically as described above, after resuspension and centrifugation. Two milliliters of distilled water was added to each sample to lyse all RBCs, and the preparations were vortexed and centrifuged again to remove the bacteria. A total of 3.5 ml of supernatant was collected and deposited on top of a discontinuous sucrose gradient consisting of 4 ml of 44% sucrose and 4 ml of 25% sucrose in Tris-saline containing the protease inhibitor cocktail in an SW41 centrifuge tube (Beckman). The gradients were centrifuged at 15,000  $\times$  g for 16 h at 4°C. The material at the 44% sucrose–25% sucrose interface was collected, diluted in Tris-saline, and concentrated by centrifugation at 450,000  $\times$  g for 20 min at 4°C in a TLA 100.3 rotor (Beckman). The pellets were resuspended in 100  $\mu$ l of Laemmli reducing sample buffer. The protein contents were separated by SDS-PAGE and visualized by Western blotting. To assess the strength of association of Pop proteins with RBC membranes, 100  $\mu$ l of lysed RBC membranes, isolated after infection, was incubated at 4°C for 1 h in Tris-saline or Tris-saline containing 5 M NaCl or 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.0). After incubation, the material was diluted in Tris-saline and concentrated by centrifugation for 20 min at 450,000  $\times$  g at 4°C. The pellets were resuspended in a minimal volume of loading buffer, and the protein contents were separated by SDS-PAGE and visualized by Western blotting. In these experiments, the CHA $\Delta$ BD/*popBD* strain was used since more Pops could be detected in RBC membranes after infection.

**Immunoprecipitation.** Liposomes containing 5% cholesterol, 35% phosphatidylcholine, and 60% phosphatidylserine (Sigma) were prepared by drying the phospholipids under N<sub>2</sub> and resuspending them by sonication in PBS at a concentration of 2 mg/ml. Recombinant PcrV, PopB, and PopD separated from their corresponding chaperones were obtained as described previously (47), with one modification: the His tag was removed from PcrV by thrombin digestion before ion-exchange chromatography. For immunoprecipitation, liposomes (final concentration, 1 mg/ml) were incubated with PcrV and/or PopB and/or PopD (final concentration of each, 30  $\mu$ g/ml) in 100  $\mu$ l of PBS at room temperature for 2 h. Liposomes were collected by centrifugation at 150,000  $\times$  g and 4°C for 20 min. After removal of the supernatants containing proteins not bound to the liposomes, the proteoliposome pellets were solubilized in 1 ml of PBS containing 500 mM NaCl and 1% Triton X-100 (PBS-N-T). Three hundred microliters of this extract was incubated for 2 h at 4°C with 4  $\mu$ l of EZview Red protein A affinity gel (Sigma) and 1  $\mu$ g of affinity-purified PopD antibodies. The protein A beads were collected by centrifugation and washed twice with PBS-N-T and once with PBS. Finally, the beads were resuspended in 50  $\mu$ l of Laemmli reducing loading buffer, and 15  $\mu$ l was separated by SDS-PAGE. PcrV, PopB, and PopD were detected by Western blotting by using the procedures described above. The amounts of PcrV, PopB, and PopD in the positive control lane were 5, 5, and 10 ng, respectively.



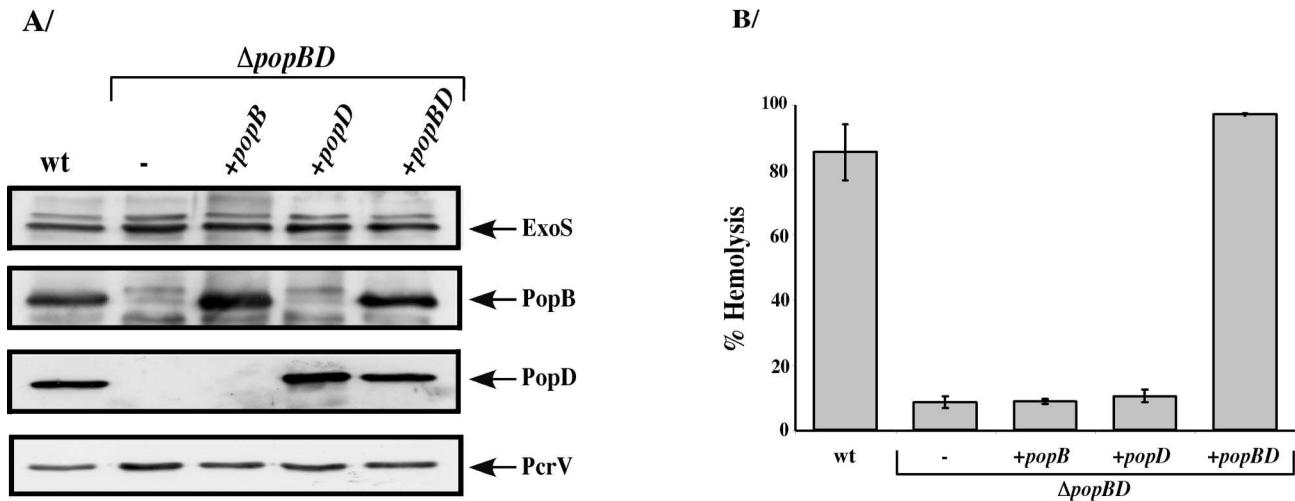


FIG. 2. Characterization of the CHA $\Delta$ BD mutant and complemented strains. (A) Western blot analysis of secreted proteins from *P. aeruginosa* strains cultivated under TTSS-inducing conditions (in LB supplemented with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Portions (25  $\mu$ l) of supernatants were directly resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and developed by Western blotting with affinity-purified anti-PcrV antibodies and total polyclonal serum raised against ExoS, PopD, and PopB. (B) Hemolytic activities of *P. aeruginosa* strains. Sheep RBCs were infected at an MOI of 1 and incubated at 37°C for 1 h. Lysis was assessed by measuring hemoglobin release into infection supernatants spectrophotometrically at 540 nm. The values are the means of at least three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations. wt, wild type.

## RESULTS

**Simultaneous requirement for PopB and PopD in pore formation.** In a previous report it was shown that a *P. aeruginosa* CHA mutant having a transposon insertion in the *pcrV* gene did not exhibit pore-forming activity on macrophages and lytic activity on erythrocytes. This mutant, however, exhibited a polar phenotype with respect to downstream genes, and consequently, neither PopB nor PopD was found to be secreted (16). To address the role of each individual protein in pore formation, we first constructed a double PopB/PopD mutation in the cytotoxic CHA strain and then complemented this mutant in *trans* with either *popB* or *popD* or with both genes (see Materials and Methods). For complementation studies, all genes were amplified by PCR and cloned downstream of the native promoter of the operon, *ppcrG*, into a pUCP20-based vector (Tables 1 and 2). The level of secretion of proteins in vitro was assessed by Western blotting by using specific polyclonal antibodies raised in rabbits against recombinant PcrV, PopB, PopD, and ExoS proteins (see Materials and Methods). Bacterial cultures were grown in LB containing EGTA, a Ca<sup>2+</sup>-chelating agent known to induce secretion of TTSS proteins (56, 60). As shown in Fig. 2A, CHA $\Delta$ BD did not secrete PopB and PopD but secreted wild-type quantities of PcrV, showing that the mutation specifically affected Pop proteins and that the secretion apparatus was intact. Indeed, all isogenic strains secreted the same quantities of the effector ExoS. When provided in *trans* either individually or together in the CHA $\Delta$ BD strain, both PopB and PopD were secreted. Neither mutation influenced Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of secretion (data not shown). We then tested the mutant and the complemented strains for the ability to provoke lysis of RBCs. Measurement of pore formation by contact-dependent TTSS by using RBCs has been reported to be an efficient and simple method that is frequently used when the translocation machin-

ery is studied (58). The parental strain CHA lysed 80 to 90% of the RBCs within 1 h when it was added at an MOI of 1. As predicted, only a basal level of hemoglobin release, which was a consequence of a type III-independent hemolytic activity (16), was detected from CHA $\Delta$ BD-infected cells. Full restoration of wild-type hemolysis was achieved only when both genes, *popB* and *popD*, were provided in *trans* (Fig. 2B).

The translocation of Exo effectors into eukaryotic cells was tested in parallel for all strains. Delivery of ExoS and ExoT into host cells has a profound effect on the cellular shape and on the actin network due to the GTPase-activating activity toward small GTP-binding proteins of the Rho family (25, 42, 52). We took advantage of NIH 3T3 fibroblasts which constitutively express GFP fused to actin (3T3/GFA) in order to monitor in vivo cell modifications during infection by fluorescent microscopy. Within 2 h postinfection with the parental CHA strain, 3T3/GFA cells showed visible perturbations of actin fibers, resulting in formation of highly fluorescent GFP-actin patches (Fig. 3). The double mutant secreting only PcrV was unable to disrupt the actin cytoskeleton of 3T3/GFA cells. Only complementation with both the *popB* and *popD* genes restored the wild-type cytotoxic activity. Strains secreting combinations of PcrV and PopB or PcrV and PopD were unable to destabilize RBC membranes or to provoke any actin rearrangement (Fig. 2B and 3). Mixing the strain secreting a combination of PcrV and PopD and the strain secreting a combination of PcrV and PopB at a 1:1 ratio prior to infection did not result in restoration of lytic activity or translocation (data not shown).

**PcrV is required for pore formation but not for PopB and PopD secretion.** To study the function of PcrV in translocation pore formation, we constructed a nonpolar and nonmarked mutant in which the *pcrV* gene in the chromosome of *P. aeruginosa* CHA was inactivated by deleting an internal part of the

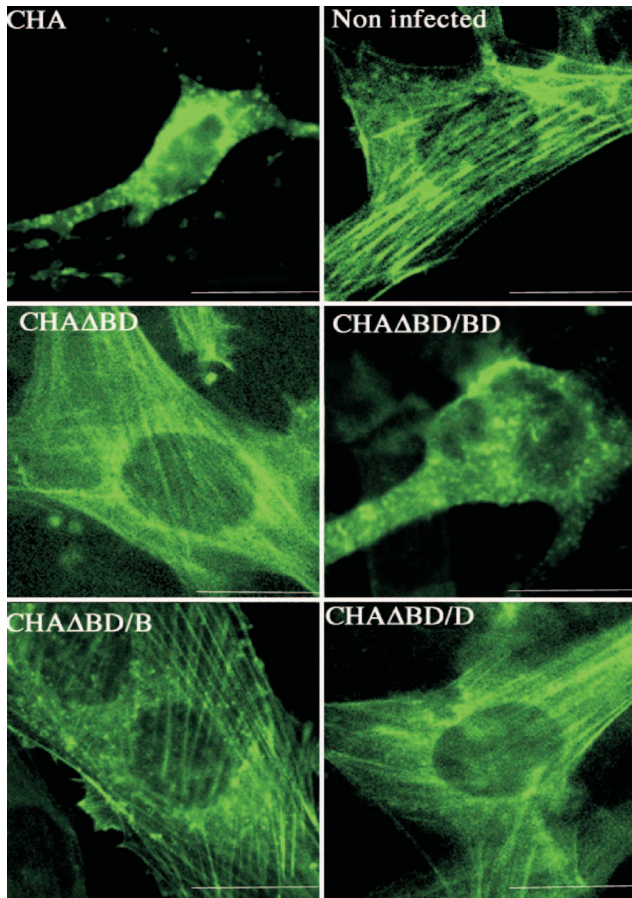


FIG. 3. Translocation of Exo effectors into NIH 3T3 fibroblasts. NIH 3T3 cells expressing constitutively an enhanced GFP- $\beta$ -actin fusion were seeded into Lab-Tek I chambers 24 h before infection. Cells were infected with the indicated strains at an MOI of 10. Modifications in cell morphology and GFP-actin distribution were monitored by using a Leica inverted microscope (DM IRE 2). The images were collected by using a DC 350F digital camera and were treated with the QFluo Pro software. Scale bars = 20  $\mu$ m.

gene (see Materials and Methods). Western blotting with affinity-purified anti-PcrV antibodies was used to screen for double recombinants that did not synthesize PcrV in vitro. To compare the secretion profiles of the parental strain CHA and the CHA $\Delta$ V mutant, supernatants from bacterial cultures, grown in LB under inducing or noninducing conditions for TTSS secretion, were directly analyzed by Western blotting. The absence of PcrV had no effect on Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of secretion, since the effector ExoS and Pop proteins were secreted only when the bacteria were grown in medium containing the Ca<sup>2+</sup>-chelating agent EGTA (Fig. 4A). Similar quantities of ExoS, PopB, and PopD were found in the supernatants of all strains. These results demonstrate that the PcrV protein is not implicated in the regulation of TTSS expression or in the secretion of the PopB/D proteins. When tested in infection models with RBCs and 3T3/GFA cells (Fig. 4B and C), the mutant did not display any pore-forming activity, confirming two previous reports in which PcrV was found to be necessary for ExoU- and ExoS-dependent cytotoxicity of cultured cells (45, 52). Complementation of the mutant with the

wild-type *pcrV* gene restored hemolysis and cytotoxicity to the parental strain levels (Fig. 4B and C). In summary, PopB and PopD secreted in the absence of PcrV were unable to induce pore formation. No restoration of lytic activity or translocation could be obtained by coinfection with the CHA $\Delta$ BD and CHA $\Delta$ V strains (data not shown). Together with data for the CHA $\Delta$ BD mutant, these results indicate that PcrV, PopB, and PopD contribute simultaneously to the assembly of a pore capable of performing hemolysis and effector trafficking.

**PcrV is required for functional assembly of the Pop pore in RBC membranes.** Since the CHA $\Delta$ V mutant was not able to provoke any membrane destabilization or effector translocation but secreted translocators PopB and PopD in vitro, we hypothesized that the PcrV protein could help insertion and/or stabilization of the Pop pore within host membranes. To test this hypothesis, RBC membrane fractions were examined for the presence of PcrV, PopB, and PopD after infection with CHA (wild type), CHA $\Delta$ BD, and CHA $\Delta$ V. Hemolysis was systematically checked at 1 h postinfection. The membrane fractions were recovered from infected RBCs by using a discontinuous sucrose gradient and were analyzed by Western blotting for the presence of Pops and PcrV (Fig. 5A). PopB and PopD were readily detected in RBC membranes infected by parental strain CHA. In order to study the type of association of Pop proteins with lipid bilayers, the isolated membranes were incubated with agents known to detach peripheral membrane proteins. After incubation with 5 M NaCl or 0.2 M carbonate (pH 11), the majority of the PopB and PopD proteins remained associated with the membranes (Fig. 5, compare lane  $\Delta$ BD/*popBD* before treatment and lanes NaCl and pH 11 after treatment). This strong association and the presence of two and one predicted transmembrane domains in PopB and PopD, respectively, indicate that these proteins are inserted in RBC membranes.

Unlike Pops, PcrV was never found in association with RBC membranes (Fig. 5A). To be sure that the absence of PcrV from membranes was not an artifact due to less efficient detection of the protein by antibodies, the detection limits of anti-PcrV and anti-PopB antibodies in Western blots were compared by using purified recombinant proteins. At a given dilution the anti-PcrV and anti-PopB antibodies had comparable detection limits (data not shown).

Notably, in membranes infected by the PcrV-deficient mutant, PopB was found to be membrane associated, indicating that PcrV is not necessary for insertion of PopB into lipid bilayers. On the other hand, PopD was absent from the CHA $\Delta$ V-infected RBC membranes, suggesting that stable association of PopD with cellular lipid bilayers requires a functional PcrV. Indeed, the localization of PopD within membranes was restored in a complemented  $\Delta$ V strain. The absence of only PopD from infecting bacteria (CHA $\Delta$ BD/B) did not affect the association of PopB with RBC membranes. The same was found for PopB, whose absence did not influence the ability of PopD to get inserted into membranes (Fig. 5A). From these experiments, we concluded that the membrane part of the translocon is composed of both PopB and PopD and that PcrV is required for the insertion and/or stability of PopD within host membranes.

**PopD directly interacts with PopB within liposomes.** Immunoprecipitation experiments were performed in order to study

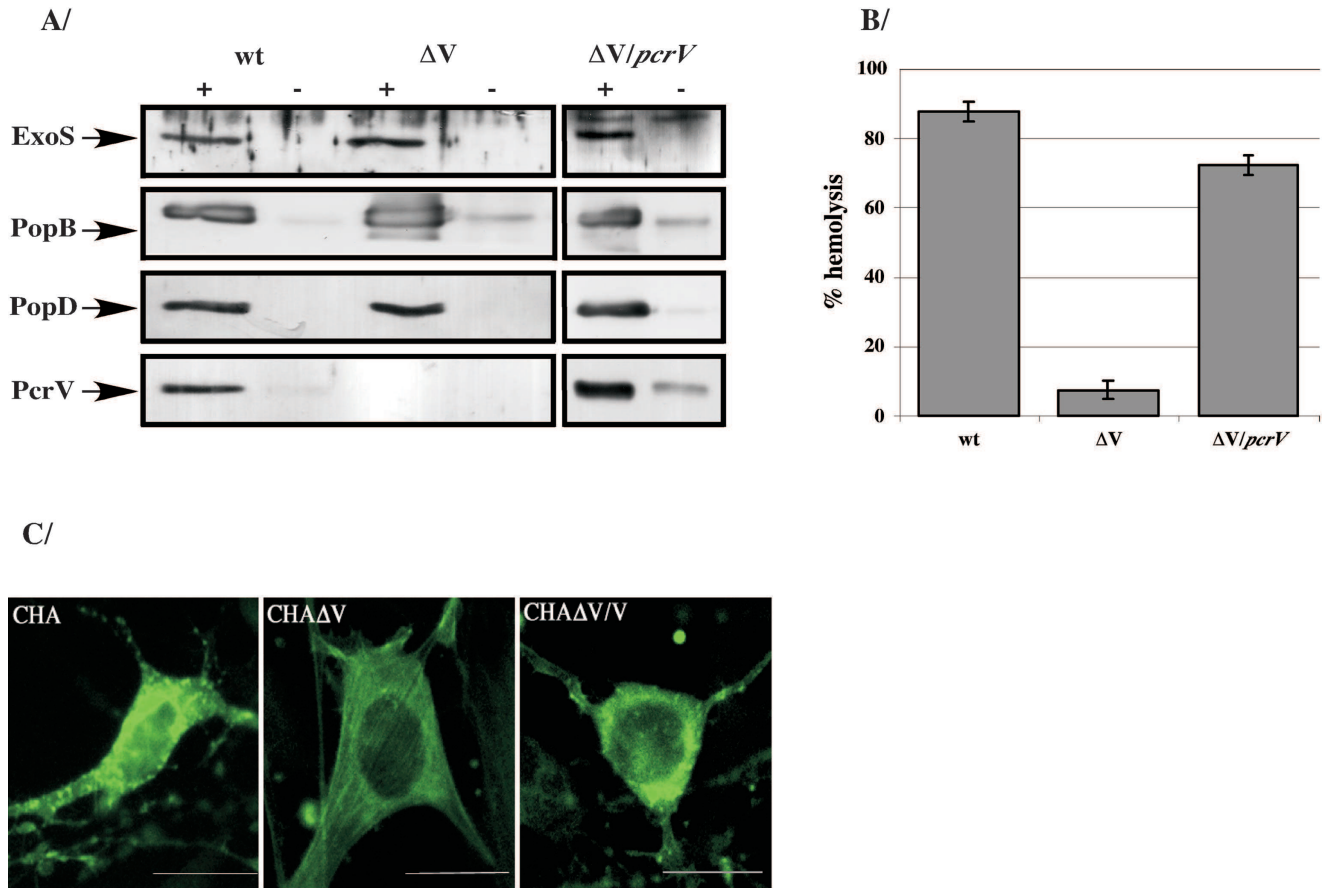


FIG. 4. CHAΔV secretes PopB and PopD but is incapable of pore formation. (A) Secretion of ExoS, PopB, PopD, and PcrV by CHA (wild type), CHAΔV, and complemented strain CHAΔV/*pcrV*. Western blot analysis was performed with culture supernatants of the strains indicated grown in noninducing conditions (LB) (lanes -) and in LB supplemented with EGTA (lanes +), representing TTSS-inducing conditions. (B) RBCs were infected with the different *P. aeruginosa* strains indicated at an MOI of 1. Hemolysis was measured after 1 h of incubation at 37°C. The values are means of three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations. (C) 3T3/GFA cells were infected at an MOI of 10 and observed for modifications of the actin cytoskeleton 2 h postinfection, as described in the legend to Fig. 3. Scale bars = 20 μm. wt, wild type.

the interactions among PcrV, PopB, and PopD (Fig. 6). As too few proteins were retained in the infected RBC membrane fraction, we used an *in vitro* liposome model of PopB/D pore assembly. We have shown previously that PopB and PopD can be purified *in vitro* in a complex with their cognate chaperone, PcrH. In acidic conditions, PopB and PopD dissociate from the chaperone and oligomerize. Furthermore, when they are in the presence of liposomes, PopB and PopD are able to form ring-like structures (47). Here, liposomes were incubated with different combinations of PcrV and/or PopB and PopD prepared in the oligomeric state. Subsequently, proteoliposomes were pelleted to purify the bound fraction and were solubilized with Triton X-100 to eliminate the possible cointeractions via lipid molecules. The corresponding protein extracts were subjected to immunoprecipitation. Antibodies raised against PopD were able to coprecipitate PopD and significant amounts of PopB from liposomes previously incubated with PcrV, PopB, and PopD (Fig. 6, lane 1). The specificity of this coprecipitation was examined by performing the same procedure with extracts lacking PopD. Anti-PopD antibodies failed to precipitate PopB from these extracts, showing that no cross-reaction between anti-PopD antibodies and PopB occurs (Fig.

6, lane 2). Notably, coprecipitation of PopD and PopB was detected in the absence of PcrV (Fig. 6, lane 3), indicating that the PopB-PopD interaction is PcrV independent. Moreover, PcrV did not coprecipitate with PopD in the presence or absence of PopB (Fig. 6, lanes 1 and 4). These results provide strong evidence that PopD directly interacts with PopB but not with PcrV.

## DISCUSSION

Type III secretion is a mechanism widely used by gram-negative pathogens to intoxicate eukaryotic cells and permits successful multiplication of the pathogen in the host. In *P. aeruginosa*, components encoded in the TTSS locus are required for efficient killing of phagocytes, lysis of RBCs, and intoxication of epithelial and endothelial cells. Different mechanisms leading to either oncosis or apoptosis of host cells have been described, and all of these mechanisms depend on proteins secreted by type III machinery.

In this work we shed light on the role of essential secreted proteins encoded within the *pcrGVH-popBD* translocation operon in *P. aeruginosa* TTSS-dependent cytotoxicity. We em-



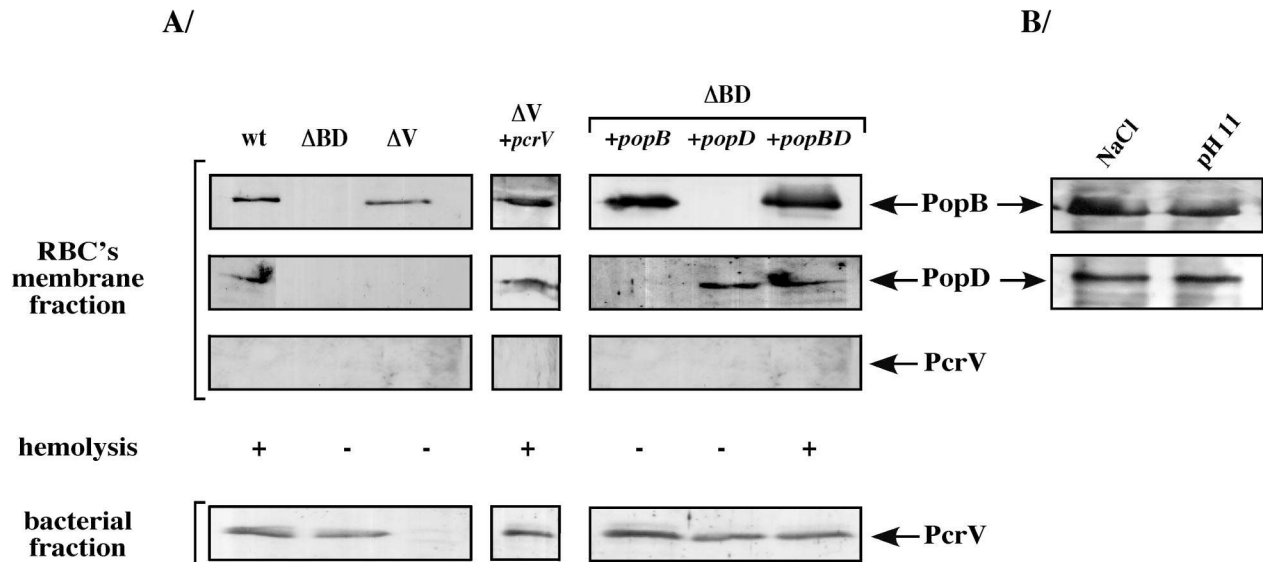


FIG. 5. Presence of PopB, PopD, and PcrV in RBC membrane fractions. (A) RBCs were infected with the different *P. aeruginosa* strains indicated at an MOI of 1 for 1 h at 37°C. Hemolysis was assayed for each reaction before total lysis was achieved by addition of sterile water. Membranes were recovered after centrifugation at the 44% sucrose–25% sucrose interface and were concentrated by ultracentrifugation. (B) Association of Pop proteins with RBC membranes isolated after infection and stripped with 5 M NaCl (lane NaCl) and 0.2 M carbonate, pH 11.0 (lane pH 11). Membrane-associated proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis by using affinity-purified PcrV and PopB antibodies and total polyclonal serum raised against PopD. The hemolysis values were >70% for lanes + and <20% for lanes –. wt, wild type.

ployed two cellular infection models to analyze specific mutations constructed within the operon. Fibroblasts constitutively expressing actin fused to GFP proved to be a good tool to monitor translocation of effectors, since perturbation of the actin fibers due to ExoS and/or ExoT effectors could be easily visualized by fluorescence microscopy *in vivo*. Measurement of hemolysis with sheep RBCs was used to evaluate pore formation, and the results displayed a good correlation with effector translocation. We found that there was a simultaneous requirement for all three proteins, PcrV, PopB, and PopD, for cell intoxication and hemolysis. Individually secreted pairs of proteins (PcrV and PopB, PcrV and PopD, or PopB and PopD) were not able to destabilize RBC membranes and did not support efficient translocation of Exo effectors. Thus, each of the three secreted proteins encoded by the *pcrGVH-popBD* operon is essential for full *P. aeruginosa* cytotoxicity. In recently published work, it was shown that *in vitro*, PopB and PopD were able to form ringlike structures and lyse liposomal membranes individually (47). The requirement for the simultaneous presence of all three proteins *in vivo* may reflect a difference in membrane composition or may be directly related to the fact that very large amounts of soluble Pop proteins were employed for *in vitro* experiments, exacerbating their activity toward membranes.

The secreted proteins PcrV, PopB, and PopD exhibit high degrees of sequence similarity with three well-studied proteins of *Yersinia* species, LcrV, YopB, and YopD, respectively (23). Several groups have proposed that LcrV, YopB, and YopD participate in formation of a channel by which the toxins cross the host plasma membrane (39, 41, 53). However, the *Yersinia* translocation pore has never been visualized, and the molecular composition of the pore is controversial. YopB and YopD expressed by *Yersinia* spp. were found to be associated with

liposomes after infection (53), and YopB was responsible for lysis of RBCs (26).

Examination of the wild-type *P. aeruginosa*-infected RBC membranes indicated that the membrane core components of the translocation pore are most probably PopB and PopD since both proteins are found in membrane fractions. Moreover, incubation of PopB/PopD-containing membranes with a high salt concentration (5 M NaCl) and at an alkaline pH (0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11), which are known to dissociate proteins that are peripherally associated with membranes via electro-

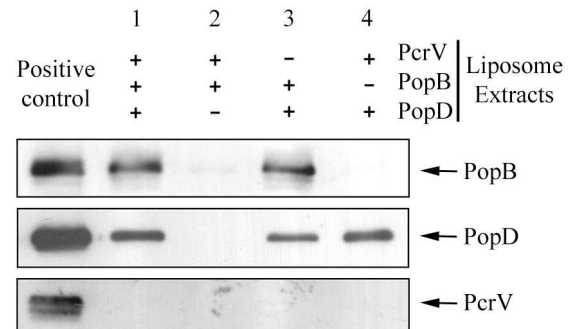


FIG. 6. Coimmunoprecipitation of PopD and PopB. Liposomes were incubated with different combinations of recombinant PcrV, PopB, and PopD and then solubilized with Triton X-100. The corresponding extracts containing all three proteins (lane 1) or lacking PopD (lane 2), PcrV (lane 3), or PopB (lane 4) were incubated with affinity-purified antibodies against PopD and beads of protein A. Precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against PcrV, PopB, and PopD. Purified recombinant proteins were used to monitor antibody reactivity (positive controls).



static and hydrophilic interactions, respectively (33, 51), did not disrupt the association of Pops with RBC membranes. Importantly, we demonstrate here that in *ex vivo* infection models, although each protein individually was able to associate with RBC membranes in the absence of another protein, no functional pore could be detected by a hemolysis assay unless both proteins were exported by the same bacterium. This could be due to the necessity for PopB-PopD interactions to form a functional pore. To test this hypothesis, we took advantage of the fact that recombinant PopB and PopD proteins oligomerize and incorporate within liposomes *in vitro* (47) to examine the possible interactions between PopB and PopD under conditions close to the conditions for *in vivo* assembly of the translocon. Indeed, not enough proteins could be recovered from the RBC membranes to determine such interactions. Significantly, our coimmunoprecipitation experiments clearly showed that PopD directly interacts with PopB. Thus, the functional translocation pore must be composed of PopB and PopD assembled into a macromolecular complex.

Construction and characterization of the nonpolar, non-marked deletion mutant CHA $\Delta$ V allowed us to obtain new insights into the function of PcrV in pore formation. The V antigen is unique and is the key component in the TTSS of *Yersinia* spp. and *P. aeruginosa*. The fact that antibodies directed towards PcrV (21, 45) and LcrV (31, 32) protect model animals against infection suggests that this protein is a possible target for alternative antibacterial treatment. Indeed, LcrV has been considered for several decades to be a major antigen of *Yersinia pestis*, and its use in vaccine-related prophylaxis against plague is being actively investigated (2, 31). Although numerous studies have contributed to our understanding of the role of *Yersinia* V protein in the regulation of Yop secretion and in Yop effector translocation, no precise and clear function has been attributed to this protein. In this work, we took advantage of the fact that deletion of *pcrV* has no effect on the expression of genes encoding PopB and PopD to investigate the role of PcrV in pore formation. In the PcrV-deficient mutant, PopB and PopD, as well as the ExoS toxin, were found to be secreted only in the absence of Ca<sup>2+</sup>. In disagreement with two recent reports (38, 45), the regulatory features of the PcrV mutant were indistinguishable from those of the parental strain. The same phenotype was found in reference strain PAO1 in which *pcrV* was deleted in the same manner (data not shown) and in a *pcrV* mutant of strain PAK (52). It is conceivable that the role of PcrV in the expression of TTSS genes is either culture condition dependent or strain dependent. Indeed, McCaw et al. (38) and Sawa et al. (45) used the same mutant that is a derivative of PA103 (an ExoU- and ExoT-positive strain), while the CHA, PAO1, and PAK strains are ExoS and ExoT positive.

Although CHA $\Delta$ V secreted Pop proteins, it was not cytotoxic toward fibroblasts and was unable to provoke hemolysis. Thus, in CHA $\Delta$ V the whole secretion apparatus was assembled and functional, but the translocation step was impaired. Furthermore, infected RBC fractionation experiments demonstrated that only PopB and PopD were associated with the host cell membranes. Although easily detected in bacterial culture supernatants with affinity-purified polyclonal antibodies, PcrV was never detected in membrane fractions even when the membrane sample was overloaded on an SDS-PAGE gel, in

agreement with the fact that in our hands purified PcrV was not able to associate with artificial liposomes (47) and the fact that this protein is accessible to protective antibodies added *in vitro* (45). However, the work described here suggests that PcrV, although not present within host cell membranes, is needed for assembly of the functional pore *in vivo* by facilitating stable insertion of PopD within membranes, since the PcrV mutant inserted only PopB into RBC membranes.

We suggest that PcrV may act somewhere between the type III needle and the PopB/D pore complex. However, this protein is not needed for a direct interaction between the bacterial secretion complex and host membranes, since PopB is found within RBC membranes even in the absence of PcrV.

No coprecipitation of PcrV with PopD could be detected, confirming two previous reports in which no interaction between Pop proteins and PcrV was found by using either affinity purification procedures (47) or immuno-overlay assays (1). It is conceivable that an unidentified protein(s) could act as an intermediate between PcrV and Pop proteins. However, the possibility that the interactions between these proteins are too labile to be detected by the methods employed so far cannot be excluded. Considering the similarities between the translocation systems of *Yersinia* and *P. aeruginosa* (6, 8), it would be interesting to determine whether LcrV participates in assembly of the functional YopB/D translocon in *Yersinia* spp. in the same manner. Although LcrV was originally implicated in the regulation and secretion of translocators, recent work of Marenne et al. showed that in an engineered poly-Yop mutant (the Null strain) the LcrV deficiency did not have an effect on YopB and YopD secretion but abolished pore formation (37). Moreover, although recently contradicted (35), interactions between LcrV and YopB and LcrV and YopD have been demonstrated (44).

In most TTSS of other gram-negative bacteria the translocation process requires three secreted proteins, two of which have been found to be associated with eukaryotic membranes. Examples are EspA, EspB, and EspC of pathogenic *E. coli* (27); SseB, SseC, and SseD encoded by a second TTSS locus of *Salmonella* spp. (40); and IpaB, IpaC, and IpaD of *Shigella flexneri* (4). Although sequence similarities between PcrV/LcrV and components of other TTSS are not evident, it is possible that these molecules play roles similar to those of EspA, SscB, and IpaD, which also lack theoretical hydrophobic domains and are not found associated with membranes. Indeed, in the TTSS of *E. coli*, the interactions between the needle and translocator components involve EspA (17, 27, 59). In conclusion, our work provides new insight into the role of the V antigen, a key TTSS component, in translocation of bacterial effectors across the plasma membrane to the host cell cytoplasm. Biochemical and structural analyses, as well as further experiments to decipher interactions among PcrV, Pops, and the needle component(s), are under way.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the French and German cystic fibrosis associations, Vaincre la mucoviscidose and Mucoviscidose e.V., and by the program Emergence of the Rhône-Alpes region. A.P. is a Ph.D. student supported by Vaincre la mucoviscidose, and E.F. is a recipient of a postdoctoral fellowship from Mucoviscidose e.V.

We are grateful to Sylvie Elsen and Anne Marie Di Guilmi for helpful and stimulating discussions and to Michel Satre for continuous support.

## REFERENCES

- Allmond, L. R., T. J. Karaca, V. N. Nguyen, T. Nguyen, J. P. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 2003. Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the *perGVH-popBD* operon of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect. Immun.* 71:2230–2233.
- Anderson, G. W., Jr., D. G. Heath, C. R. Bolt, S. L. Welkos, and A. M. Friedlander. 1998. Short- and long-term efficacy of single-dose subunit vaccines against *Yersinia pestis* in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:793–799.
- Berthelot, P., I. Attree, P. Plesiat, J. Chabert, S. de Bentzmann, B. Pozzetto, and F. Grattard. 2003. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. *J. Infect. Dis.* 188:512–518.
- Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, and P. Sansonetti. 1999. The tripartite type III secretor of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* 147:683–693.
- Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3027–3030.
- Bröms, J. E., A. L. Forslund, A. Forsberg, and M. S. Francis. 2003. Dissection of homologous translocon operons reveals a distinct role for YopD in type III secretion by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* 149:2615–2626.
- Bröms, J. E., A. L. Forslund, A. Forsberg, and M. S. Francis. 2003. PcrH of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for secretion and assembly of the type III translocon. *J. Infect. Dis.* 188:1910–1922.
- Bröms, J. E., C. Sundin, M. S. Francis, and A. Forsberg. 2003. Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 188:239–249.
- Buttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* 10:186–192.
- Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer. 2002. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *BioTechniques* 33:760, 762–763.
- Coburn, J., and D. W. Frank. 1999. Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect. Immun.* 67:3151–3154.
- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihist genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1315–1352.
- Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:735–774.
- Dacheux, D., I. Attree, C. Schneider, and B. Toussaint. 1999. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 67:6164–6167.
- Dacheux, D., I. Attree, and B. Toussaint. 2001. Expression of *exsA* in *trans* confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on nontoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect. Immun.* 69:538–542.
- Dacheux, D., J. Goure, J. Chabert, Y. Usson, and I. Attree. 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* 40:76–85.
- Delahay, R. M., S. Knutton, R. K. Shaw, E. L. Hartland, M. J. Pallen, and G. Frankel. 1999. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274:35969–35974.
- Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson, and A. R. Hauser. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147:2659–2669.
- Fleiszig, S. M., J. P. Wiener-Kronish, H. Miyazaki, V. Vallas, K. E. Mostov, D. Kanada, T. Sawa, T. S. Yen, and D. W. Frank. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect. Immun.* 65:579–586.
- Frank, D. W. 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 26:621–629.
- Frank, D. W., A. Vallis, J. P. Wiener-Kronish, A. Roy-Burman, E. G. Spack, B. P. Mullaney, M. Megdoud, J. D. Marks, R. Fritz, and T. Sawa. 2002. Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J. Infect. Dis.* 186:64–73.
- Frithz-Lindsten, E., Y. Du, R. Rosqvist, and A. Forsberg. 1997. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 25:1125–1139.
- Frithz-Lindsten, E., A. Holmstrom, L. Jacobsson, M. Soltani, J. Olsson, R. Rosqvist, and A. Forsberg. 1998. Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 29:1155–1165.
- Galan, J. E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322–1328.
- Garrity-Ryan, L., B. Kazmierczak, R. Kowal, J. Comolli, A. Hauser, and J. N. Engel. 2000. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect. Immun.* 68:7100–7113.
- Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Hombel, and H. Wolf-Watz. 1996. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.* 15:5812–5823.
- Hartland, E. L., S. J. Daniell, R. M. Delahay, B. C. Neves, T. Wallis, R. K. Shaw, C. Hale, S. Knutton, and G. Frankel. 2000. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol. Microbiol.* 35:1483–1492.
- Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel, and J. Rello. 2002. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Care Med.* 30:521–528.
- Hauser, A. R., and J. N. Engel. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect. Immun.* 67:5530–5537.
- Hauser, A. R., S. Fleiszig, P. J. Kang, K. Mostov, and J. N. Engel. 1998. Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:1413–1420.
- Hill, J., C. Copse, S. Leary, A. J. Stagge, E. D. Williamson, and R. W. Titball. 2003. Synergistic protection of mice against plague with monoclonal antibodies specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 71:2234–2238.
- Hill, J., S. E. Leary, K. F. Griffin, E. D. Williamson, and R. W. Titball. 1997. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect. Immun.* 65:4476–4482.
- Knodler, L. A., B. A. Vallance, M. Hensel, D. Jäckel, B. B. Finlay, and O. Steele-Mortimer. 2003. *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol. Microbiol.* 49:685–704.
- Konyecsi, N. M., and V. Deretic. 1988. Broad-host-range plasmid and M13 bacteriophage-derived vectors for promoter analysis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 74:375–386.
- Lee, V. T., C. Tam, and O. Schneevind. 2000. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275:36869–36875.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2:1051–1060.
- Marenne, M. N., L. Journet, L. J. Mota, and G. R. Cornelis. 2003. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb. Pathog.* 35:243–258.
- McCaw, M. L., G. L. Lykken, P. K. Singh, and T. L. Yahr. 2002. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol. Microbiol.* 46:1123–1133.
- Neyt, C., and G. R. Cornelis. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol.* 33:971–981.
- Nikolaus, T., J. Deiwick, C. Rappl, J. A. Freeman, W. Schroder, S. I. Miller, and M. Hensel. 2001. SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J. Bacteriol.* 183:6036–6045.
- Nordfelth, R., and H. Wolf-Watz. 2001. YopB of *Yersinia enterocolitica* is essential for YopE translocation. *Infect. Immun.* 69:3516–3518.
- Pederson, K. J., A. J. Vallis, K. Aktories, D. W. Frank, and J. T. Barbieri. 1999. The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 32:393–401.
- Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish. 2001. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* 183:1767–1774.
- Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis. 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* 180:1207–1214.
- Sawa, T., T. L. Yahr, M. Ohara, K. Kurahashi, M. A. Gropper, J. P. Wiener-Kronish, and D. W. Frank. 1999. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.* 5:392–398.
- Scaife, R. M., S. A. Courtneidge, and W. Y. Langdon. 2003. The multi-adapter proto-oncoprotein Cbl is a key regulator of Rac and actin assembly. *J. Cell Sci.* 116:463–473.

47. Schoehn, G., A. M. Di Guilmi, D. Lemaire, I. Attree, W. Weissenhorn, and A. Dessen. 2003. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* **22**:4957–4967.
48. Schweizer, H. D. 1993. Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques* **15**:831–834.
49. Schweizer, H. P. 1992. Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable *oriT* and the counter-selectable *Bacillus subtilis sacB* marker. *Mol. Microbiol.* **6**:1195–1204.
50. Shime, N., T. Sawa, J. Fujimoto, K. Faure, L. R. Allmond, T. Karaca, B. L. Swanson, E. G. Spack, and J. P. Wiener-Kronish. 2001. Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')(2) in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* **167**:5880–5886.
51. Steck, T. L., and J. Yu. 1973. Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants. *J. Supramol. Struct.* **1**:220–232.
52. Sundin, C., M. C. Wolfgang, S. Lory, A. Forsberg, and E. Frithz-Lindsten. 2002. Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* **33**:265–277.
53. Tardy, F., F. Homble, C. Neyt, R. Wattiez, G. R. Cornelis, J. M. Ruysschaert, and V. Cabiliaux. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.* **18**:6793–6799.
54. Toussaint, B., I. Delic-Attree, and P. M. Vignais. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**:416–421.
55. Vallis, A. J., V. Finck-Barbancon, T. L. Yahr, and D. W. Frank. 1999. Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect. Immun.* **67**:2040–2044.
56. Vallis, A. J., T. L. Yahr, J. T. Barbieri, and D. W. Frank. 1999. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect. Immun.* **67**:914–920.
57. Van Delden, C., and B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:551–560.
58. Viboud, G. I., and J. B. Bliska. 2002. Measurement of pore formation by contact-dependent type III protein secretion systems. *Methods Enzymol.* **358**:345–350.
59. Wilson, R. K., R. K. Shaw, S. Daniell, S. Knutton, and G. Frankel. 2001. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **3**:753–762.
60. Yahr, T. L., L. M. Mende-Mueller, M. B. Friese, and D. W. Frank. 1997. Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **179**:7165–7168.

---

Editor: J. T. Barbieri

## ANNEXE 3

Article 3: Goure J., Broz P., Attree O., Cornelis G. et Attree I. (2005).

Protective anti-V antibodies inhibits *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis.*, sous-presse.



# Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes

Julien Goure<sup>\*1</sup>, Petr Broz<sup>\*2</sup>, Olivier Attree<sup>3</sup>, Guy R. Cornelis<sup>2</sup> and Ina Attree<sup>1♦</sup>

<sup>1</sup> Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, CEA-Grenoble, UMR5092 CNRS, Grenoble, France, <sup>2</sup>Biozentrum der Universität Basel, Switzerland, and <sup>3</sup>Centre de recherches du service de santé des armées, La Tronche, France

Pathogenic *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* share a similar type III secretion/translocation system. The translocation system consists of three secreted proteins, YopB/PopB, YopD/PopD and LcrV/PcrV, the latter being known to be a protective antigen. In an in vitro assay, the translocation system causes the lysis of erythrocytes infected with wild type *P. aeruginosa*. Wild type *Y. enterocolitica* is not hemolytic but a multi-knockout mutant deprived of all the effectors and of YopN ( $\Delta$ HOPEMN) is hemolytic. In the presence of antibodies directed against PcrV and *Y. pestis* LcrV, the hemolytic activity of *P. aeruginosa* was inhibited. Similarly, the hemolytic activity of *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMN was inhibited in the presence of anti-LcrV antibodies. The assembly of the translocon, composed of PopB/D and YopB/D proteins, was disturbed in immunoprotected erythrocyte membranes, mimicking the phenotypes of V knockout mutants. Thus, protective antibodies raised against the V antigens of *Yersinia* and *P. aeruginosa* act at the level of the translocon pore formation in membranes of infected host cells, by blocking the function of LcrV/PcrV. The hemolysis assay could be adapted for high throughput screening of anti-infectious compounds targeting specifically the type III translocon.

Injunctosomes are complex nanomachines allowing pathogenic or symbiotic bacteria to inject proteins across the membrane of eukaryotic host cells. They consist of a basal body containing a type III secretion (T3S) apparatus and a stiff needle which can be itself extended by a flexible pilus or filament [1, 2]. Upon contact with a eukaryotic cell membrane, the injectosome secretes, presumably in a sequential manner, a set of proteins called translocators and intracellular effectors [3, 4]. The translocators are a group of generally three proteins that are absolutely required for the proper delivery of the effectors across the host cell membrane [3-12].

Pathogenic members of the genus *Yersinia*, *Y. pestis*, the causative agent of plague and enteric pathogens *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, share a common injectosome called Ysc and a common set of translocators and effectors, called Yops. The translocators are called YopB, YopD and LcrV. The latter is a *bona fide* Yop with a different name because it was discovered more than forty years ago as a soluble protective antigen linked to virulence (hence named V antigen) [13, 14], long before the concept of type III secretion was shaped [15]. Interestingly, the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*,

which is evolutionary remote from enterobacteriaceae has a very similar injectosome, called Psc and a set of similar translocators called PopB, PopD and PcrV [16-18]. Both sets of translocators have been shown to form pores in erythrocytes (RBC) [5, 9], in eukaryotic cell membranes [19, 20] and in liposomes [21]. Pore formation is readily detectable with wild type *P. aeruginosa* but not with wild type *Y. enterocolitica*. Only *Y. enterocolitica* mutants that are devoid of the effectors or of the control protein YopN make readily detectable pores [5, 20, 11]. An interpretation of this observation is that Yop effectors that are translocated obstruct the translocation channel [5, 20]. However, it has also been shown that the Rho-GAP activity of YopE prevents membrane damage to cells infected with wild type bacteria [22]. When YopN is missing, secretion is contact-independent and effectors are not efficiently translocated [11]. What is the structure of the translocation pore, at what stage is the translocation pore inserted and how is it connected to the needle of the injectosome is not clear yet. It is tempting to consider the translocation pore as an integral part of the injectosome but, unlike the needle, it could only be assembled after contact with a target cell.

\* These two authors equally contributed to the work

♦ Corresponding author

Mailing address: DRDC/BBSI, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France.

Email: [iattreedelic@cea.fr](mailto:iattreedelic@cea.fr)

Tel: 33 438783483

Fax: 33 438784499



It has been shown that PopB and PopD are able to oligomerize *in vitro* and that their interaction with lipids promotes the formation of ring-like structures with external and internal diameters of 80 and 40 Å respectively [23]. Although PcrV was unable to interact with lipids either *in vitro* or *in vivo* [9, 23], it was shown to be required for proper assembly of the PopB/D translocon in membranes of infected erythrocytes [9].

*Y. pestis* LcrV possesses highly protective antigenic character and antibody therapy against bubonic and pneumonic plague has been shown effective when tested in animal models of disease [24-26]. Similarly, active immunisation with PcrV or passive immunisation with anti-V antibodies provides a high level of protection on animal models against lethal *P. aeruginosa* infections [7, 27]. Furthermore, administration of anti-PcrV F(ab')<sub>2</sub> in a *P. aeruginosa*-provoked sepsis model, reduces the inflammatory response and bacteremia levels [28]. Although the mechanism of action is not known, even *in vitro*, anti-V antibodies prevent the cytotoxicity of bacteria toward cultured cells [7, 29, 30].

In this study we examined the action of anti-V antibodies on translocation pore formation, in *P. aeruginosa* and in *Y. enterocolitica* hemolysis assay. With *P. aeruginosa*, it was already shown that a high level of hemolysis can be obtained at low multiplicity of infection (MOI of 1) within 1 h of co-incubation. Another advantage of this model is that RBC are not a limiting factor and their membranes can be isolated after infection and analysed for translocon proteins without being contaminated with infecting bacteria [9, 31]. Here we applied the RBC assay on *Yersinia* by using poly-Yop effector mutants of *Y. enterocolitica* [20]. We demonstrate that the antibodies raised against the V antigens, through their direct interaction with V proteins, inhibit bacteria-induced hemolysis by

acting at the level of type III translocon assembly in host cell membranes, for both pathogenic species.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and growth conditions

The *P. aeruginosa* strain used is the cytotoxic cystic fibrosis isolate CHA [19, 32]. *P. aeruginosa* were grown either on Pseudomonas Isolation Agar (Difco) plates or in liquid Luria broth (LB) medium at 37°C with agitation. All the mutants of *Y. enterocolitica* used are derived from the strain E40, a strain from serotype O:9 [4, 11]. *Y. enterocolitica* strains were inoculated to an OD<sub>600</sub> of 0.1 and cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth (ICN) for 3 h at 37°C. *In vitro*, secretion of *Y. enterocolitica* was triggered by sodium oxalate [11].

### Production and purification of antibodies

The production and purification of the rabbit-derived anti-PcrV, anti-PopB and anti-PopD polyclonal antibodies (Pabs) have been described [9, 23]. MAb 166 [27] was provided by Dr. D. W. Frank (Medical College of Wisconsin, USA). The LcrV coding sequence was obtained by PCR from genomic DNA of the *Y. pestis* strain EV76 (gift from Dr E. Carniel, Pasteur Institute, Paris), using the primers 5' GATAAGAATTCGAGCCTACGAACAAAACCCA and 5' AAGGATCGTCTCGACTTACATAATTACCTCGTGTCA. The PCR product was digested with *EcoRI* and *Sall*, and cloned into the expression plasmid pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences). A soluble Glutathione-S-Transferase (GST)-LcrV fusion was produced in *E. coli* and purified on GSTrap (Amersham Biosciences). The GST-LcrV protein fusion bound on the column was cleaved with PreScission Protease (Amersham), resulting in the elution of purified LcrV.

Strains	Relevant genotype or phenotype	Source or reference
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
CHA	mucoid, cytotoxic CF isolate	[32]
<b><i>Y. enterocolitica</i></b>		
E40	wild type strain with the plasmid pYV40	[39]
ΔHOPEMN	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub>	[11]
ΔHOPEMNV	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>lcrV</i> Δ <sub>6-319</sub>	[11]
ΔHOPEMNVQ	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>lcrV</i> Δ <sub>6-319</sub> <i>yopQ</i> <sub>17</sub>	[20]
ΔHOPEMNB	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>yopB</i> Δ <sub>89-217</sub>	[20]
ΔHOPEMND	pYV40 <i>yopE</i> <sub>21</sub> <i>yopH</i> Δ <sub>41-352</sub> <i>yopO</i> Δ <sub>65-558</sub> <i>yopP</i> <sub>23</sub> <i>yopM</i> <sub>23</sub> <i>yopN</i> <sub>45</sub> <i>yopD</i> Δ <sub>121-165</sub>	[20]
ΔN	pYV40 <i>yopN</i> <sub>45</sub>	[6]

Table 1. Bacterial strains

Three CD1 mice were immunized by 100- $\mu$ l intramuscular injections of 10  $\mu$ g purified LcrV in PBS containing 2% alhydrogel (Superfos Biosector, Denmark) and 10  $\mu$ g of CpG oligonucleotide [33] as adjuvant. In each animal after two immunizations separated by a two weeks interval, the ELISA titer (highest dilution giving twice the OD obtained with naïve CD1 serum) of anti-LcrV serum antibodies was above 1/50 000. For production of polyclonal anti-LcrV antibodies, the best responder mouse was given an intraperitoneal (ip) boost of the same respective amounts of LcrV, alhydrogel and CpG, followed five days later by a final ip injection containing LcrV, CpG and 5  $\times 10^5$  cells of TG180 sarcoma cells. The ascitis fluid was collected one week later and the IgG were purified on Protein A (Mab Trap, Amersham). The BCA method (Interchim) was used to determine the concentration of purified antibodies.

### Hemolysis assay and immunoprotection experiment

Hemolysis assay was performed as described [9]. Briefly, sheep RBCs (Eurobio) were washed three times in PBS, pH 7.4 (150 mM NaCl), and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) at 5  $\times 10^8$  RBCs  $\text{ml}^{-1}$  at 4°C. Bacteria were grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 1.0, centrifuged and resuspended in RPMI-1640 at 5  $\times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ . Hemolysis assays were initiated by mixing 100  $\mu$ l of RBCs and 100  $\mu$ l of bacteria in round-bottomed 96-well plates, which were then centrifuged at 2000  $g$  for 10 min and incubated at 37°C for 1 h. The release of hemoglobin was measured and % of hemolysis was calculated as described [31]. Immunoprotection experiments were done by incubating bacteria for 45 min with different concentration of antibodies at room temperature prior the standard hemolytic assay. Negative controls included corresponding pre-immune rabbit serums. In titration experiment, a constant concentration of 5 ng/ $\mu$ l of Pabs was added to bacteria, then increasing amounts of the recombinant PcrV or LcrV were incubated with the mixture bacteria-Pabs for 45 min at room temperature.

### Red blood cell membrane isolation

RBCs were resuspended in Tris-saline (30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) at 1.10<sup>10</sup> cells  $\text{ml}^{-1}$ . Before the infection, 3.10<sup>9</sup> bacteria were incubated with 180  $\mu$ g of Pabs in 700  $\mu$ l of Tris-saline buffer, for 45 min at room temperature. Then, hemolytic reactions were prepared in 50 ml conical tubes. The mixture of bacteria and antibodies were mixed with 300  $\mu$ l of RBC at 1.10<sup>10</sup> cells  $\text{ml}^{-1}$  and 1 ml of a protease inhibitor cocktail 2X (PIC; Complete™, Roche). Samples were centrifuged at 2 000  $g$  at room temperature for 10 min and incubated at 37°C for 1 h. Hemolysis was assessed spectrophotometrically as described above. Then, 3 ml of distilled water at 4°C was added to each sample to lyse all RBCs, and these were vortexed and centrifuged again to remove bacteria. The RBC

membranes were isolated by floatation on a sucrose density gradient as described [9]. The material at the 44/25% sucrose interface was collected, diluted in Tris-saline and concentrated by centrifugation at 450 000  $g$  for 20 min 4°C in a TLA 100.3 rotor (Beckman). The pellets were resuspended in Laemmli sample buffer and analyzed by Western blotting.

### Immunoblotting analysis

Immunoblotting analysis were performed with primary Pabs against YopB (gift from A. Forsberg), PopB, PopD, PcrV [9] and Mabs against YopD [20] and LcrV [11] and a secondary antibody conjugated to horse radish peroxidase (Sigma). Membranes were developed using the ECL kit (Amersham Biosciences).

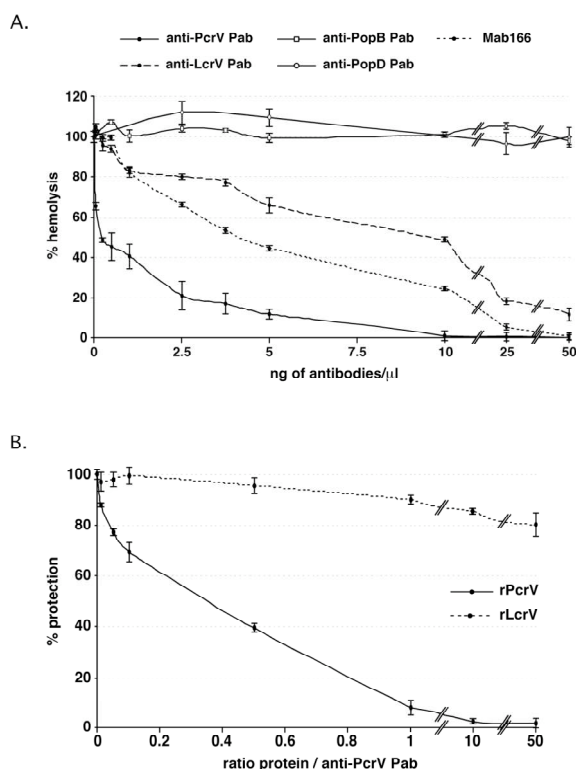
## RESULTS AND DISCUSSION

Since PcrV was found to be necessary for PopB/D pore assembly in RBC membranes [9], we asked whether antibodies (abs) directed against PcrV would interfere with the PopB/D-dependent hemolysis induced by cytotoxic *P. aeruginosa* strain CHA. Affinity-purified polyclonal antibodies (Pabs) raised against translocator proteins PopB and PopD did not inhibit hemolysis. Up to 50 ng/ $\mu$ l of both antibodies had no protective effect. In contrast, affinity purified anti-PcrV Pabs [9] mixed either with bacteria or with RBC prior to infection inhibited hemolysis, in a dose-dependent manner (Fig.1A). As few as 0.25 ng/ $\mu$ l of abs were able to reduce *P. aeruginosa*-induced lysis by 50%. Increasing the amounts of antibodies up to 10 ng per  $\mu$ l of infection assay resulted in complete protection of RBC from lysis. Mab166 is a monoclonal anti-PcrV antibody that has been shown to protect mouse from lethal *P. aeruginosa* infection [27]. In the hemolysis assay, Mab166 could prevent hemolysis, but 18-fold more Mab166 than Pabs was required to obtain 50% of inhibition. The higher neutralization activity of the Pab could be due to the binding of several PcrV epitopes, or to a higher affinity of some antibody component as compared to Mab 166. The former hypothesis is favoured because in a competition ELISA, a 100-fold excess of Pab could not hinder the binding of Mab166 to rPcrV (data not shown). This could have practical importance because efficient Mab neutralization of PcrV would then require a combination of several Mabs, as seems to be the case for Botulinum toxin type A [34]. LcrV from *Yersinia* and PcrV from *P. aeruginosa* share 41% amino acid identity [16] and they most likely share the same function in the assembly of the translocon. We raised mouse Pabs against recombinant LcrV protein (rLcrV) from *Y. pestis*. Similarly to anti-PcrV Pabs and Mab166, anti-LcrV Pabs inhibited *P. aeruginosa*-induced hemolysis, i.e. 50% of inhibition was obtained with 10 ng/ $\mu$ l of anti-LcrV Pabs. In summary, these



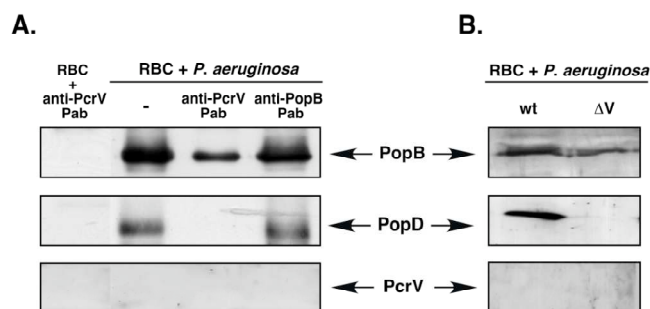
data show that the Pabs directed against PcrV and LcrV as well as the protective monoclonal antibody Mab166 hinder cytotoxic *P. aeruginosa* from lysing RBC.

LcrV and PcrV are surface-exposed antigens ([29, 35] and Attree I., unpublished results) and therefore probably accessible to antibodies. To further confirm that the protection against hemolysis is due to the direct interaction between abs and the antigen during the infection process, we set up competition experiments, where the abs necessary to confer 90-100% protection was kept constant and increasing amounts of the recombinant antigen were added to the infection mixture. With rPcrV, as few as 3-4 molecules per 10 molecules of abs were sufficient to restore 50% of hemolysis showing that the protection is due to direct PcrV/Ab interaction (Fig. 1B).



**Figure 1.** Immunoprotection of RBC against *P. aeruginosa*-induced hemolysis. **A/** Lysis of RBC by T3S of *P. aeruginosa* at MOI of 1, at 37°C after 1 h in presence of different antibodies added to bacteria prior to co-incubation. Anti-PcrV and anti-PopB Pabs were affinity-purified from rabbit serums, anti-PopD was total rabbit serum and anti-LcrV Pabs were purified on Protein A from mouse serum. Mab166 [27] is a protective monoclonal antibody raised against PcrV. **B/** Titration of protective abs by recombinant LcrV (rLcrV) or PcrV (rPcrV). Hemolysis assay was performed in the presence of immunoprotective anti-PcrV Pabs added in quantities to achieve 100% of protection. Purified recombinant PcrV and LcrV proteins were added to the assay and hemolysis was measured after 1 h of incubation.

RBC lysis occurs by osmotic shock following the formation of PopB/D pores within erythrocytes membranes. Since PcrV is required for functional Pop pore formation, we addressed the question whether PopB/D insert into membranes in the presence of anti-V antibodies. The hemolysis assay was scaled up and antibodies were added at levels necessary to achieve approximately 90-100% protection. After one hour of incubation, the RBC were lysed by the addition of water and the membranes were purified by sucrose gradient as described previously [9]. The purified membranes were examined for the presence of Pop translocators by Western blotting. *P. aeruginosa*-infected RBC membranes contained both translocators, PopB and PopD, as previously reported ([9] and Fig. 2). Notably, in the presence of anti-PcrV Pabs, PopD protein was absent from infected RBC membranes (Fig. 2), corroborating the phenotype of the PcrV knockout bacteria that were unable to assemble the functional translocon ([9] and Fig. 2). It is to be noted that systematically less PopB could be detected in membranes purified from these immunoprotection experiment. Antibodies directed against PopB were not able to disturb PopB/D pore inserted into host membranes (Fig. 2), in agreement with the incapacity of these abs to immunoprotect infected RBC. These results show that anti-PcrV antibodies either block the proper insertion of pore-forming proteins, or destabilize them within membranes. The fact that PopB was still found in immunoprotected membranes, although unable to form functional pores, suggests that the protective abs do not prevent the contact between the host cell and the bacterial injectisome.

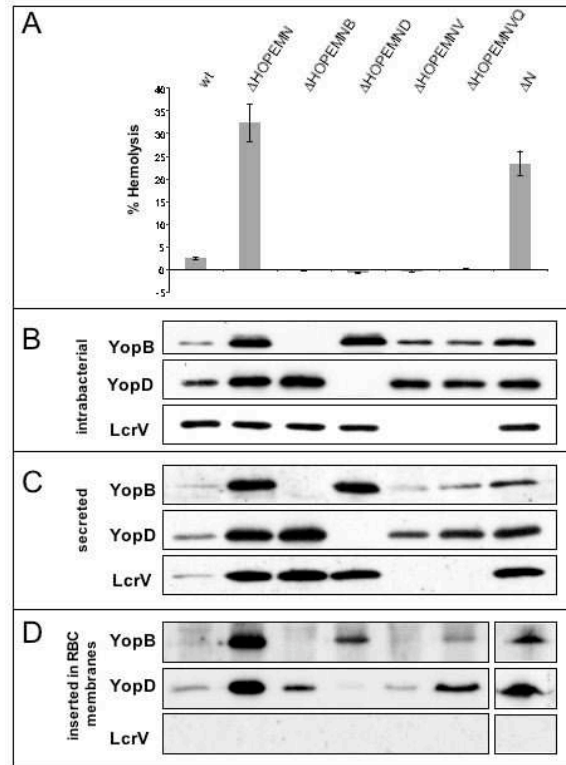


**Figure 2.** Assembly of the *P. aeruginosa* PopB/D translocon in immunoprotected RBC membranes. **A/** RBC membranes were isolated on sucrose gradients following hemolysis assays performed in the presence of either protective anti-PcrV Pabs or anti-PopB Pabs. **B/** RBC membranes isolated following hemolysis assay with wt and the *pcrV* mutant [9]. Translocon content of PopB, PopD and PcrV within membranes was analysed by Western blotting.

Since the serum raised against the *Y. pestis* rLcrV prevented to some degree the *P. aeruginosa* T3S-induced hemolysis, we tested several *Y. enterocolitica* strains in order to apply the hemolysis immunoprotection assay. As already reported by several authors [5, 20], the *Yersinia* wt strains had a very low hemolytic activity, even when the bacteria-host cell contact was forced with centrifugation. Indeed, no detectable hemolysis could be observed at one hour post-infection (Fig. 3A). Neyt *et al.* (1999) and Marenne *et al.* (2003) [11, 20], reported that, in contrast to the wt strain, the mutant strain  $\Delta$ HOPEMN lacking type III-secreted effectors (YopH, -O, -P, -E, -M) as well as the control protein YopN [36] provoke macrophage cell lysis through the formation of pores presumably constituted by translocators YopB and YopD. Notably, in the standard RBC assay,  $\Delta$ HOPEMN bacteria lysed around 30% of the erythrocytes within 1h of co-incubation at a MOI of 1, a value lower to that observed with the cytotoxic *P. aeruginosa* but still very significant (Fig. 3A). The  $\Delta$ HOPEMN-induced hemolysis was dependent on the presence of LcrV, since the mutant  $\Delta$ HOPEMNV showed only basal level of hemolysis. In addition, LcrV was not directly hemolytic to RBCs since mutants  $\Delta$ HOPEMNB and  $\Delta$ HOPEMND, which secrete wt amounts of LcrV were not hemolytic. This result is in agreement with data showing that *P. aeruginosa* strains secreting PcrV are non-hemolytic [9]. *lcrV* mutants are known to produce less YopB and YopD than wt bacteria [37-39], and this effect can be attenuated by mutating also *yopQ* [11] (Fig. 3C). We thus also tested a  $\Delta$ HOPEMNVQ mutant in hemolysis assay, which was also non-hemolytic (Fig. 3A), showing that the lack of hemolysis observed with  $\Delta$ HOPEMNV was not due to insufficient secretion of YopB and YopD but directly to the absence of LcrV (Fig 3C).

Since PcrV is required for correct PopB/D pore formation we addressed the function of LcrV in *Y. enterocolitica*. RBC membrane fractions were examined for the presence of the translocators after infection with the same strains of *Y. enterocolitica* (Fig. 3D). Only YopD was clearly visible in membranes of RBC infected with wt bacteria. In contrast YopB and YopD were readily detectable in membranes of RBC infected with  $\Delta$ HOPEMN and  $\Delta$ N bacteria. This difference reflects the fact that wt bacteria produce and secrete less Yops upon contact with RBCs than *yopN* mutant bacteria which are deregulated for Yop secretion (Fig. 3B,C) [36]. This shows that centrifugation-achieved contact with RBCs does not trigger optimal Yop secretion of wt bacteria. Both YopB and YopD could be detected in membranes of RBC infected with  $\Delta$ HOPEMNVQ, but the amount of both translocators, especially YopB, was reduced in comparison with  $\Delta$ HOPEMN or  $\Delta$ N bacteria. This may simply reflect the fact that  $\Delta$ HOPEMNVQ bacteria secrete less YopB/D than  $\Delta$ HOPEMN bacteria but it should be noted that they secrete at

least as much YopB as wt bacteria (Fig. 3C). Nevertheless, although both YopB and YopD could be detected in the membrane, no pore was formed. This suggested that although LcrV was necessary for the proper assembly of the YopB/D pore in the host cell membrane, it was not for the insertion of the translocators within host membranes.

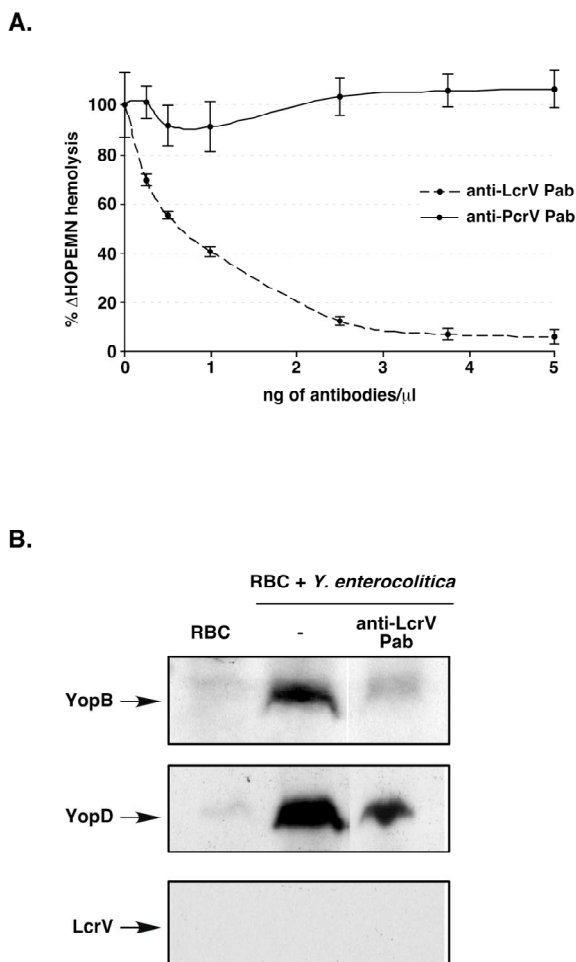


**Figure 3.** Lysis of RBC by the Ysc-Yop T3S from *Y. enterocolitica*. wt, wild type bacteria;  $\Delta$ HOPEMN, a multi-effector  $Ca^{2+}$ -blind knockout [20],  $\Delta$ HOPEMNB,  $\Delta$ HOPEMN lacking translocator YopB [20];  $\Delta$ HOPEMND,  $\Delta$ HOPEMN lacking translocator YopD [20];  $\Delta$ HOPEMNV,  $\Delta$ HOPEMN lacking translocator LcrV [11];  $\Delta$ HOPEMNVQ,  $\Delta$ HOPEMNV lacking YopQ;  $\Delta$ N, wt lacking regulator YopN [6]. The removal of YopQ minimizes the negative effect of the *lcrV* deletion on synthesis of YopB and YopD [11]. **A/** % of hemolysis after one hour of contact, at a MOI of 1. **B,C,D/** Western blot analysis of YopB, YopD and LcrV carried out on **(B)** intrabacterial proteins, **(C)** total amount of proteins secreted by the bacteria during the infection and **(D)** proteins inserted into the membranes of erythrocytes.

Anti-LcrV abs and anti-PcrV abs were then tested for their capacity to protect erythrocytes from hemolysis by *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMN. As can be seen on Fig. 4A., anti-LcrV Pabs were capable of protecting RBC. The specific anti-LcrV serum was as immunoprotective as were the PcrV Pabs in the *P. aeruginosa*/RBC assay. However anti-PcrV

Pabs had no protective effect on  $\Delta$ HOPEMN-induced hemolysis, suggesting that, although some epitope(s) are shared by LcrV and PcrV, other neutralization epitope(s) are unique to LcrV.

Next we addressed the question of YopB/D pore formation in the presence of anti-LcrV antibodies. *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMN bacteria were preincubated for 30 mins with antibodies at levels necessary to provide 90-100% of protection. Immunoprotected membranes were purified and examined for the presence of the translocators by western blotting. The amount of YopB was severely reduced in the presence of protective antibodies. It is to be noted that also less YopD could be detected in immunoprotected membranes (Fig. 4B). This suggested that anti-LcrV, similarly to anti-PcrV antibodies, prevented the functional assembly of the translocation pore.



**Figure 4.** Immunoprotection of RBC from HOPEMN-induced hemolysis using anti-LcrV or anti-PcrV antibodies. **A/** % of hemolysis in the presence of various amounts of affinity purified anti-PcrV Pabs and Protein A-purified anti-LcrV Pabs. **B/** Western blot analysis of YopB, YopD and LcrV carried out on the membranes of erythrocytes, either not protected or protected by anti-LcrV abs.

PcrV/LcrV protective antigens would thus act as extrabacterial chaperones or scaffolds in the sense that they would bind unfolded PopB/YopB and PopD/YopD emerging from the bacterium and ensure their correct folding and assembly into a functional pore. This hypothesis, which is supported by the fact that the T3S apparatus exports unfolded proteins [40] is compatible with the known localisation of LcrV at the bacterial surface [29, 35]. It implies that V interacts, at least transiently with B and D which is in agreement with the observation of Sarker *et al.* [39]. However, it does not imply that V remains bound to the assembled pore and thus is not contradictory to results showing the absence of direct interactions between PcrV and Pop proteins folded *in vitro* [9, 23]. Finally, although inconsistent with the idea that the purified LcrV on its own forms channels, the chaperone or scaffold hypothesis is compatible with the observation that LcrV determines the size of the pore [10, 18].

In conclusion, we demonstrated that the protective abs directed against the V antigens (PcrV and LcrV) of *P. aeruginosa* and *Yersinia*, act by preventing the assembly of a functional type III translocon in host cell membranes. In addition, our work shows that the hemolysis assay is well-suited to study the function of the type III translocon and could be adapted for screening of anti-infectious molecules targeting specifically bacterial toxin translocons.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. D. W. Frank for kindly providing the MA166 antibody, Dr. A. Forsberg for anti-YopB antibody, Dr. E. Carniel for *Y. pestis* EV76 genomic DNA, Sylvie Elsen for helpful discussions and Valerie Gros for excellent technical assistance.

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> The authors do not have any commercial or other association that might pose a conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding).

<sup>2</sup> Work in Ina Attrée's group is in part financed by French Cystic Fibrosis Association "Vaincre la Mucoviscidose" (I10327) and by the program "Emergence 2003" from the Rhône-Alpes region. Work in Basel is financed by the Swiss National Science Foundation (Grant 32-65393.01).

## REFERENCES

- Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **1999**;284:1322-8
- Cornelis GR, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **2000**;54:735-74

3. Rosqvist R, Magnusson KE and Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J* **1994**;13:964-72
4. Sory MP, Cornelis GR. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **1994**;14:583-94
5. Hakansson S, Schesser K, Persson C, et al. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* **1996**;15:5812-23
6. Boland A, Sory MP, Iriarte M, Kerbouch C, Wattiau P and Cornelis GR. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *Embo J* **1996**;15:5191-201
7. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **1999**;5:392-8
8. Lee VT, Tam C and Schneewind O. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem* **2000**;275:36869-75
9. Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A and Attree I. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **2004**;72:4741-50
10. Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, et al. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **2001**;39:620-32
11. Marenne MN, Journet L, Mota LJ and Cornelis GR. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* **2003**;35:243-58
12. Sundin C, Wolfgang MC, Lory S, Forsberg A and Frithz-Lindsten E. Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **2002**;33:265-77
13. Burrows TW, Bacon GA. The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis*. *Br J Exp Pathol* **1958**;39:278-91
14. Lawton WD, Erdman RL and Surgalla MJ. Biosynthesis and Purification of V and W Antigen in *Pasteurella Pestis*. *J Immunol* **1963**;91:179-84
15. Cornelis GR, Wolf-Watz H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **1997**;23:861-7
16. Yahr TL, Mende-Mueller LM, Friese MB and Frank DW. Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **1997**;179:7165-8
17. Frithz-Lindsten E, Holmstrom A, Jacobsson L, et al. Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **1998**;29:1155-65
18. Bröms JE, Sundin C, Francis MS and Forsberg A. Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **2003**;188:239-49
19. Dacheux D, Attree I, Schneider C and Toussaint B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **1999**;67:6164-7
20. Neyt C, Cornelis GR. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **1999**;33:971-81
21. Tardy F, Homble F, Neyt C, et al. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *Embo J* **1999**;18:6793-9
22. Viboud GI, Bliska JB. A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *Embo J* **2001**;20:5373-82
23. Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W and Dessen A. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *Embo J* **2003**;22:4957-4967
24. Une T, Brubaker RR. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *yersiniae*. *J Immunol* **1984**;133:2226-30
25. Roggenkamp A, Geiger AM, Leitritz L, Kessler A and Heesemann J. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect Immun* **1997**;65:446-51
26. Motin VL, Nakajima R, Smirnov GB and Brubaker RR. Passive immunity to *yersiniae* mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect Immun* **1994**;62:4192-201
27. Frank DW, Vallis A, Wiener-Kronish JP, et al. Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* **2002**;186:64-73
28. Shime N, Sawa T, Fujimoto J, et al. Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')<sub>2</sub> in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **2001**;167:5880-6
29. Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **1999**;32:961-76
30. Weeks S, Hill J, Friedlander A and Welkos S. Anti-V antigen antibody protects macrophages from *Yersinia pestis* -induced cell death and promotes phagocytosis. *Microb Pathog* **2002**;32:227-37
31. Blocker A, Gounon P, Larquet E, et al. The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **1999**;147:683-93
32. Toussaint B, Delic-Attree I and Vignais PM. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**;196:416-421
33. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* **1998**;160:870-6
34. Nowakowski A, Wang C, Powers DB, et al. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**;99:11346-50
35. Fields KA, Nilles ML, Cowan C and Straley SC. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun* **1999**;67:5395-408
36. Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M and Wolf-Watz H. The surface-located YopN protein is involved in

calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol **1991**;5:977-86

37. Bergman T, Hakansson S, Forsberg A, et al. Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH and LcrV. J Bacteriol **1991**;173:1607-16

38. Skrzypek E, Straley SC. Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca<sup>2+</sup> response, and virulence of *Yersinia pestis*. J Bacteriol **1995**;177:2530-42

39. Sarker MR, Neyt C, Stainier I and Cornelis GR. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. J Bacteriol **1998**;180:1207-14

40. Feldman MF, Muller S, Wuest E and Cornelis GR. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. Mol Microbiol **2002**;46:1183-97



## Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections graves chez les individus immunodéprimés et chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Cette pathogénicité repose sur de nombreux facteurs de virulence, dont l'un, le système de sécrétion de type III (SSTT) est présent chez un grand nombre de bactéries pathogènes à Gram négatif. Ce système de sécrétion permet à la bactérie d'injecter des effecteurs cytotoxiques directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible. Chez *P. aeruginosa*, le SSTT est constitué d'un appareil de sécrétion, appelé Psc (Pop secretion) permettant le passage des effecteurs à travers les membranes bactériennes, et d'un translocon, codé par l'opéron *pcrGVHpopBD*, permettant l'injection des effecteurs cytotoxiques dans le cytosol de la cellule eucaryote. Nous avons montré dans le laboratoire que l'isolat clinique CHA de *P. aeruginosa* est capable d'échapper à l'activité bactéricide des polymorphonucléaires neutrophiles humains (PMNs) et d'induire une mort rapide par oncose des phagocytes (Dacheux *et al.*, 2000).

Dans un premier volet, l'utilisation des hématies comme modèle cellulaire m'a permis de montrer que cette oncose est précédée par la formation de pores, de taille estimée entre 28 et 35 Å, dans la membrane cytoplasmique de ces cellules. Des expériences de mutagenèse montrent que la formation de ces pores requiert les protéines PcrV, PopB et PopD. L'analyse par Western blot de membranes isolées d'hématies infectées par *P. aeruginosa* indiquent que les protéines PopB et PopD constituent le pore de translocation inséré dans la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. La protéine PcrV, qui n'est jamais retrouvée dans la fraction membranaire d'hématies infectées par *P. aeruginosa*, agit à la surface de la bactérie comme une « chaperonne extracellulaire » responsable de l'assemblage de PopB et PopD en un complexe hétéro-oligomérique.

Le second volet traite du mécanisme d'action des anticorps protecteurs anti-PcrV contre les infections à *P. aeruginosa*. Des expériences de fractionnement d'hématies infectées par *P. aeruginosa* en présence de ces anticorps protecteurs a permis d'établir que ces derniers inhibent l'assemblage du pore de translocation du SSTT.

**Mots clés** *Pseudomonas aeruginosa*, facteurs de virulence, système de sécrétion de type III, pore de translocation, anticorps protecteurs